



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**La proteína FlgP es un componente estructural del cuerpo basal
necesario para la formación del flagelo en *Rhodobacter sphaeroides***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
Caleb Gustavo Pérez González

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR

Dr. Georges Dreyfus Cortes
Instituto de Fisiología celular

Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Instituto de Biotecnología

CIUDAD DE MÉXICO,
NOVIEMBRE, 2019



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.

Agradecimientos

A mi comité tutorial: Dra. Laura Camarena, Dr. Georges Dreyfus y Dr. Lorenzo Segovia por dar seguimiento, aportar ideas y observaciones para desarrollar el presente trabajo, así como de opiniones y consejos personales durante mi formación académica.

A mi comité sinodal, por atender de manera exhaustiva la revisión de este trabajo, aportar ideas y enriquecer el manuscrito final.

Se agradece el apoyo técnico de la Q.F.B Aurora Osorio, Dr. Javier de la Mora, Dra. Teresa Ballado y Miriam Vázquez. Así como a la Unidad de Secuenciación de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número CVU/Becario: 235996. Los recursos materiales para la realización de este trabajo fueron parcialmente cubiertos por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DEGAPA-UNAM) gracias al donativo PAPIIT-IN204317 y de el CONACyT donativo CB2014-235996.

Dedicatorias

A mi madre, mi familia y compañeros de vida a quienes comparto la alegría de este nuevo logro.

A la Dra. Laura Camarena, agradezco el espacio en su laboratorio y su acompañamiento durante mi formación académica. Mi mayor reconocimiento a su labor científica y dedicación para la formación de futuros científicos.

Al Dr. Sebastián, agradezco las críticas, ideas y comentarios que enriquecieron este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio.

Aurora, Clelia y Anet. Quienes acompañaron mis primeros experimentos y hoy son testigos de una historia que concluye exitosamente.

Y a las muchas generaciones; Paulina, Ana Laura, Luis David, Thelma, Benjamín, José, Elidet, David, Manuel, Vero, Mariana, Fernanda y Jimena. Quienes han transitado el laboratorio, buscando un contacto científico y han encontrado un lugar increíble para hacer ciencia.

Índice

RESUMEN	2
Abstract	3
INTRODUCCION	4
-La motilidad de bacterias mediada por flagelo	4
-La estructura flagelar	5
-El sistema estator	8
-Biosíntesis flagelar	11
-Diversidad del cuerpo basal flagelar	16
El motor de <i>Vibrio spp</i>	18
El motor de <i>Campylobacter jejuni</i>	20
El sistema flagelar de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	22
El sistema Fla1 de <i>R. sphaeroides</i>	22
Particularidades del sistema Fla1 de <i>R. sphaeroides</i>	24
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	46
MATERIALES Y MÉTODOS	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
Anexo	76

Resumen

Rhodobacter sphaeroides es una alfa-proteobacteria que tiene dos grupos de genes flagelares denominados *fla1* y *fla2*. El conjunto de genes flagelares *fla2* se considera endógeno del grupo de las alfa-proteobacterias, mientras que el conjunto *fla1* es filogenéticamente cercano a los genes flagelares presentes en las gama-proteobacterias. En condiciones de laboratorio *R. sphaeroides* expresa constitutivamente los genes *fla1*.

Dentro del locus que contiene la mayoría de los genes *fla1*, existen varios marcos de lectura de función desconocida o poco caracterizada. Uno de estos marcos de lectura denominado RSP_0035, potencialmente codifica para una lipoproteína de 177 residuos. La secuencia de aminoácidos de RSP_0035 es un 25% similar a la proteína FlgP descrita en *Vibrio cholerae* y 27% similar a su homólogo en *Campylobacter jejuni*. Debido a dicha similitud, renombramos al marco de lectura RSP_0035 como FlgP.

En este trabajo se aisló y caracterizó una cepa mutante en el gen *flgP*. Se determinó que en ausencia de *flgP*, la cepa es incapaz de ensamblar el filamento y gancho. La presencia de FlgP en preparaciones de estructuras flagelares aisladas sugiere que esta proteína es un componente estructural del flagelo. Estudios de interacción proteína-proteína demostraron que FlgP es capaz de interactuar consigo misma y con las proteínas flagelares FlgH y FlgT, las cuales forman respectivamente, el anillo L (presente en la membrana externa), y el anillo H (ubicado en el periplasma), lo que sugiere que la lipoproteína FlgP podría formar un complejo multimérico, que debe ubicarse cercano a los anillos L y H. La ausencia de gancho en la mutante $\Delta flgP$ puede ser explicada debido a un defecto en el ensamblaje del anillo L, a través del cual el eje flagelar atraviesa dicha barrera.

ABSTRACT

The flagellar lipoprotein FlgP has been identified in several species of bacteria, and its absence provokes different phenotypes. In this study, we show that in the alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* WS8, a $\Delta flgP$ mutant is unable to assemble the hook and filament. In contrast, the membrane/supramembrane (MS) ring and the flagellar rod appear to be assembled. In the absence of FlgP a severe defect in the transition from rod to hook polymerization occurs. In agreement with this idea, we noticed a reduction in the amount of intracellular flagellin and the chemotactic protein CheY4, both encoded by genes dependent on σ^{28} . This suggests that in absence of *flgP* the switch to export the anti-sigma factor, FlgM, does not occur. The absence of FlgP was detected by Western blot in samples of isolated wild-type filament basal bodies, indicating that FlgP is an integral part of the flagellar structure. In this regard, we show that FlgP interacts with FlgH and FlgT proteins, indicating that FlgP should be localized closely to the L and H rings. We propose that FlgP could affect the architecture of the L ring, which has been recently identified to be responsible for the rod-hook transition.

INTRODUCCIÓN

La motilidad de bacterias mediada por flagelo

Los mecanismos de motilidad en bacterias involucran dos principales elementos; por un lado, estructuras especializadas como flagelos y pili tipo IV y, por otro lado, condiciones físico-químicas como luz temperatura, pH y moléculas de señalización o compuestos químicos.

Particularmente, el nado bacteriano mediado por flagelo representa una estrategia eficiente que permite el desplazamiento de la célula tanto en medios líquidos como en ambientes semisólidos o viscosos; en este último caso, el flagelo favorece la colonización de ciertas superficies como la mucosa intestinal o sustratos viscosos.

Dependiendo de cada especie, uno o varios flagelos rotan en una sola dirección, emulando el movimiento de una propela que impulsa a la bacteria en el medio líquido. En *E. coli* y *Salmonella enterica*, alrededor de 8 a 10 flagelos rotan en sentido contrario a las manecillas del reloj o CCW (counter-clockwise) para impulsar a la bacteria hacia un estímulo positivo. El cambio de rotación en el sentido de las manecillas del reloj o CW (clockwise), disocia la propela formada por flagelos y permite reorientar a la bacteria hacia una nueva dirección determinada al azar (Silverman y Simon, 1974). De este modo, el nado bacteriano puede ser definido como el resultado de alternar dos tipos de movimientos, que son las corridas y las reorientaciones (Falke *et al.*, 1997).

Los estudios moleculares y bioquímicos realizados *E. coli* y *S. enterica* constituyen una de las referencias más sólidas para estudiar la biosíntesis y la estructura del flagelo.

En términos generales, la expresión de los genes flagelares depende de un regulador maestro que controla la transcripción del resto de los genes flagelares que son expresados siguiendo un patrón jerárquico (Tsang y Hoover, 2014 ; McCarter, 2006). Del mismo modo, el ensamblaje del flagelo ocurre de acuerdo a la disponibilidad de los sustratos y una vez ensamblado se divide en tres partes morfológicas: filamento, gancho y cuerpo basal (Aizawa, 1996) (fig. 1).

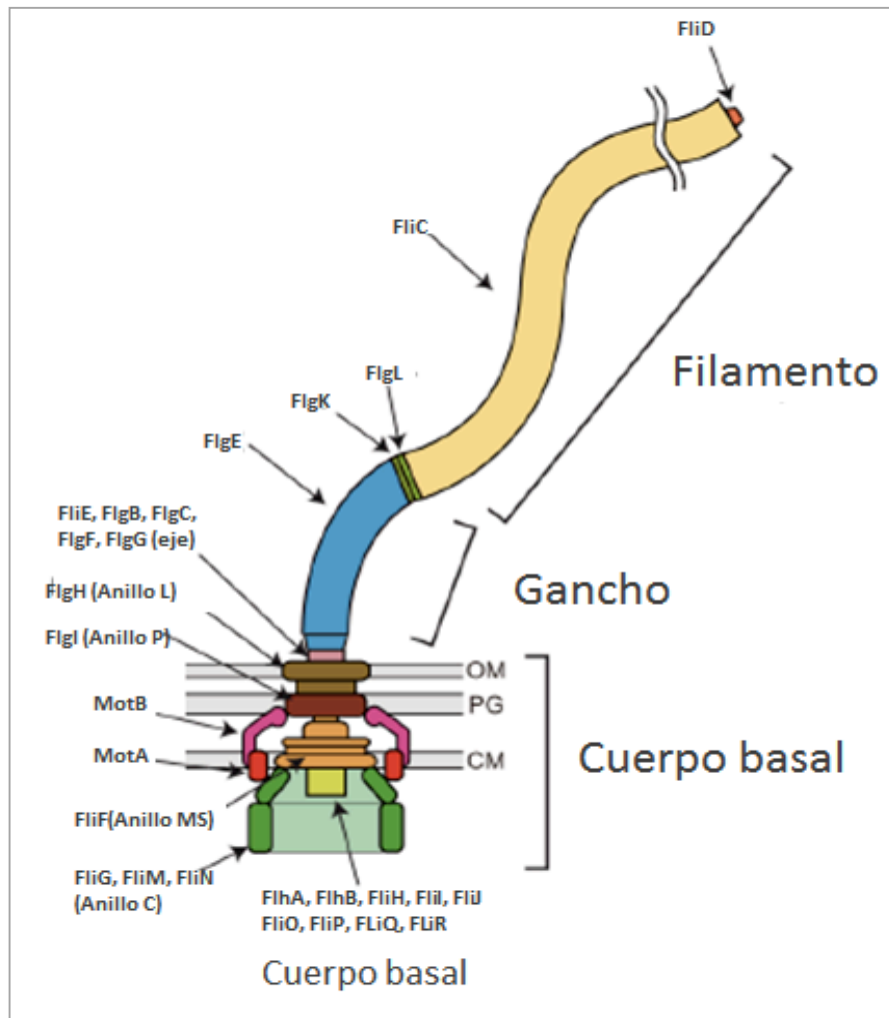


Figura 1. Esquema general de la estructura flagelar presente en *E. coli* y *S. enterica*. Tomado de (Morimoto y Minamino, 2014).

LA ESTRUCTURA FLAGELAR.

El filamento se localiza comúnmente en la parte externa de la célula, aunque en algunas especies, por ejemplo, en *Borrelia burgdorferi* el filamento se encuentra en el espacio periplásmico (Holt, 1978).

En *E. coli* así como en muchas otras especies, el filamento se encuentra formado por miles de subunidades de una sola proteína denominada flagelina, o FliC. El filamento es una estructura rígida que se organiza de manera helicoidal y puede

alcanzar un tamaño de aproximado a 15 micrómetros de longitud (Chevance y Hughes, 2008)

Debido al gran número de subunidades necesarias para su formación, esta estructura representa uno de los componentes de mayor costo energético para su producción, y por ello existen mecanismos que evitan la síntesis de FliC, cuando existen problemas con la formación o el funcionamiento de la estructura que comprende al complejo gancho-cuerpo basal (Hughes *et al.*, 1993).

Durante la formación del filamento los monómeros de FliC se ensamblan con la ayuda de la proteína FliD (también nombrada como HAP2, Hook Associated Protein), esta última se ubica en la punta del filamento en formación y facilita el plegamiento de las subunidades de FliC (Yonekura *et al.*, 2000).

La base del filamento se une al gancho a través de dos anillos o componentes adaptadores, denominados HAP1 y HAP3, constituidos por las proteínas FlgK y FlgL, respectivamente (Homma *et al.*, 1990) Ambas proteínas son indispensables para la formación del flagelo ya que cepas sin FlgL o FlgK carecen de flagelo y son no móviles (Homma *et al.*, 1984). El cambio de un solo residuo en la proteína FlgL (HAP3), provoca cambios en la estructura helicoidal del filamento que son inducidos por la rotación del motor (Fahrner *et al.*, 1994). Lo anterior indica que un apropiado acoplamiento de las subunidades de FlgK y FliC es indispensable no solo para servir de soporte estructural sino también para restringir las transiciones polimórficas de la hélice.

El gancho, corresponde a una estructura de aproximadamente 55 nanómetros de longitud y está formado por subunidades de la proteína FlgE. Al igual que el filamento, el gancho se localiza en la parte externa de la célula y permite la transmisión de la fuerza de rotación del motor, ubicado en el citoplasma, al filamento. Estructuralmente, el gancho y el filamento son similares. Sin embargo, en contraste con este último, el gancho es una estructura flexible. Dicha propiedad le permite transmitir la fuerza de rotación en un amplio rango de direcciones. Se postula que la flexibilidad del gancho obedece a la forma en la cual las subunidades interactúan en una cierta región de la estructura polimérica, siendo éstas mas laxas entre las subunidades del gancho (Samatey *et al.*, 2004). Además, la flexibilidad del gancho favorece la formación de

trenzas o haces de flagelos, que favorece el desplazamiento en especies con flagelos peritricos (Brown *et al.*, 2012)

En la envoltura celular se ensambla la estructura mas compleja del flagelo bacteriano, denominada cuerpo basal flagelar (fig.1). Al menos 20 proteínas distintas forman parte de esta estructura que se extiende desde el citoplasma hasta la membrana externa (Liu y Ochman, 2007). El cuerpo basal está integrado por una serie de anillos y un eje. En la parte central del anillo ubicado en la membrana se encuentra el aparato de exportación flagelar.

El eje, es una estructura cilíndrica y hueca, de aproximadamente 28 nm de longitud, la cual alcanza la membrana externa y atraviesa la pared de peptidoglicano. La parte proximal del eje está constituida por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF y se estima que tiene un tamaño de aproximadamente 10 nm (Jones y Macnab, 1990). En la pared de peptidoglicano el anillo P, constituido por la proteína FlgI, rodea la estructura del eje y funciona como un cojinete o rodamiento. El eje distal está constituido por 26 subunidades de la proteína FlgG, y con ellas se extiende por 4 vueltas hasta alcanzar la membrana externa (ME), aproximadamente 15 nm (Okino *et al.*, 1989).

La base del eje se une al anillo MS, ubicado en la membrana interna mediante la proteína acopladora FliE. El anillo MS está constituido por 26 subunidades de la proteína FliF y presenta un diámetro de aproximadamente 25 nm en su parte citoplasmática (Macnab, 2003). Al centro de este anillo, se ensambla el aparato de exportación de tipo III que es indispensable para la secreción de las proteínas axiales que forman el eje, gancho y filamento (Minamino y Macnab, 1999).

En la base del anillo MS, en el espacio citoplásmico, se localiza el anillo C, también conocido como el complejo interruptor (switch complex). Este componente está constituido por 26, 34 y 136 subunidades, respectivamente de las proteínas FliG, FliM y FliN. La función principal de este anillo consiste en convertir en trabajo mecánico la energía generada por el paso de protones a través de los estatores que rodean la estructura flagelar (fig. 1). Además, cumple un papel esencial en el control de la dirección de la rotación CW vs. CCW, mediante la interacción de FliM y probablemente

de FliN, con la proteína quimio receptora CheY (Sarkar *et al.*, 2010; Morimoto y Minamino, 2014).

El sistema estator

Los estatores flagelares son las unidades encargadas de conducir iones a través de la membrana y acoplar el flujo con la generación de torque. En función de los iones de acoplamiento, los motores flagelares se dividen en al menos dos tipos, uno es impulsado por H^+ y se encuentra presente en *E. coli* y *S. enterica*; el otro tipo es impulsado por iones Na^+ y se encuentra presente en especies marinas del genero *Vibrio* y en bacterias extremadamente alcalofílicas, *i.e.* *Bacillus alcalophilus* es capaz de usar Na^+ o K^+ como iones acopladores pero la distribución de ese tipo de estatores queda aun por ser analizada (Terashima *et al.*, 2008; Terahara *et al.*, 2012).

El estator del motor impulsado por H^+ consta de cuatro subunidades de la proteína MotA y dos de MotB (Braund *et al.*, 2004) (fig. 2B).

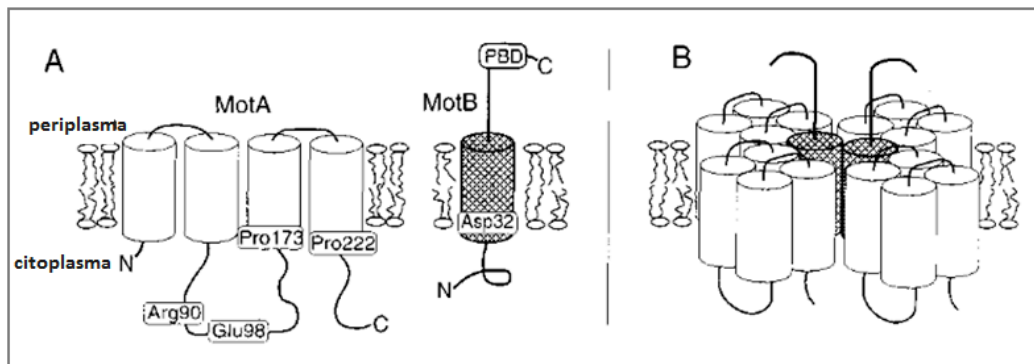


Figura 2. A) Topología de la proteína MotA, conformada por 4 cruces transmembranales y un largo dominio citoplásmico que incluye a los residuos Arg90 y Glu98 importantes para la interacción con FliG. MotB posee el residuo conservado, Asp32 importante para la conducción de H^+ . B) Arreglo estequiométrico de la unidad estator conformada por 4MotA-2MotB. Tomado de Braun y Blair, 2001.

MotA es una proteína con cuatro cruces transmembranales, con dos pequeñas asas periplásmicas entre las regiones transmembranales 1-2 y 3-4, un largo dominio citoplásmico comprendido entre la segunda y tercera región transmembranal (fig. 2A) (Braun *et al.*, 2004). El asa citoplásmica de MotA contiene a los residuos Arg90 y Glu98, que son importantes para interactuar electrostáticamente con los residuos Asp289 y Arg281 de la proteína FliG en el anillo C (fig. 3). En *E. coli* ha sido demostrado que estas interacciones son necesarias para la generación de torque (Zhou *et al.*, 1998). Sin embargo, estas interacciones tienen funciones distintas en *S. enterica*, ya que la interacción entre Arg90 en MotA y Asp289 en FliG es crítica para el ensamblaje del estator en el motor, mientras que la interacción entre Glu98 en MotA y Arg281 en FliG es importante para la generación de torque (Morimoto *et al.*, 2013).

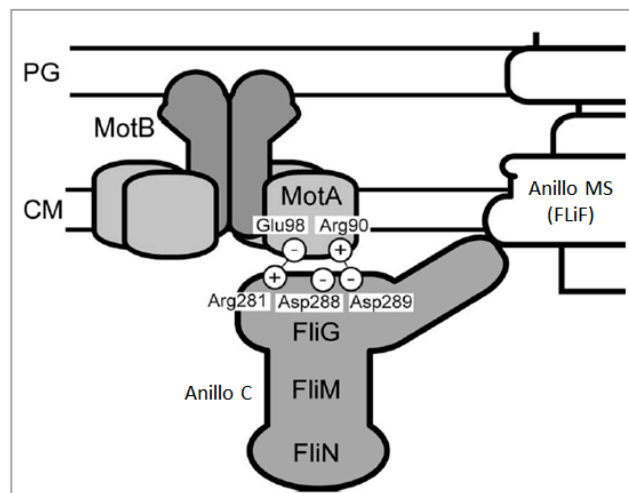


Figura 3. Diagrama esquemático de la interacción electrostática entre los residuos MotA_Arg90/FliG-Asp289 y MotA_Glu98/FliG_Arg281. Tomado de Morimoto *et al.*, 2013.

La proteína MotB se organiza en un homodímero y junto con MotA forma los canales iónicos que permiten el paso de los iones a través de la membrana (fig. 4A). MotB tiene una sola hélice transmembranal cercana al extremo N-terminal, en la cual se encuentra el residuo conservado Asp 32. Este residuo de ácido aspártico se encuentra en el extremo proximal de MotB-TM y es crítico para la translocación de protones a través del canal (Zhou *et al.*, 1998). En la región periplásmica, los aminoácidos 53 a 66, pueden estructurarse en forma de una hélice anfipática y de este modo emulan la función de un tapón (plug), el cual impide el paso de protones cuando los estatores no se encuentran incorporados en el flagelo (fig. 4) (Hosking *et al.*, 2006; Morimoto *et al.*, 2010)

La región carboxilo terminal de MotB contiene un dominio de unión a peptidoglicano responsable de anclar el estator a la pared celular (Dean *et al.*, 1984). El análisis de la estructura de diferentes variantes del dominio C-terminal de MotB, ha llevado a postular que esta región puede adoptar dos conformaciones estables. En una de ellas, la región periplásmica de MotB, en los estatores inactivos, adoptaría una conformación compacta incapaz de interactuar con la pared celular y se asume que la región hidrofóbica del tapón se ubicaría en estrecho contacto con la membrana. En contraste, al interactuar con el rotor, la región periplásmica de MotB adoptaría una conformación extendida debido al cambio conformacional de una hélice que conecta el tapón con el dominio de unión a peptidoglicano, dicho cambio permitiría entonces el paso de protones (fig. 4B) (Kojima *et al.*, 2018; Andrews *et al.*, 2017).

Dependiendo de cada especie, se han estimado diferentes unidades de estatores alrededor del flagelo. Por ejemplo en *S. enterica* y *E. coli*, el número estimado es cercano a las 12 subunidades de estatores (Reid *et al.*, 2006), mientras que en *Helicobacter pylori* se han estimado hasta 18 subunidades (Chaban *et al.*, 2018). Actualmente, se propone que la velocidad del desplazamiento de bacterias en el medio líquido está relacionada con el número de unidades estatores en el flagelo. A mayor número de estatores, mayor velocidad y torque para impulsar a la bacteria (Chen *et al.*, 2011).

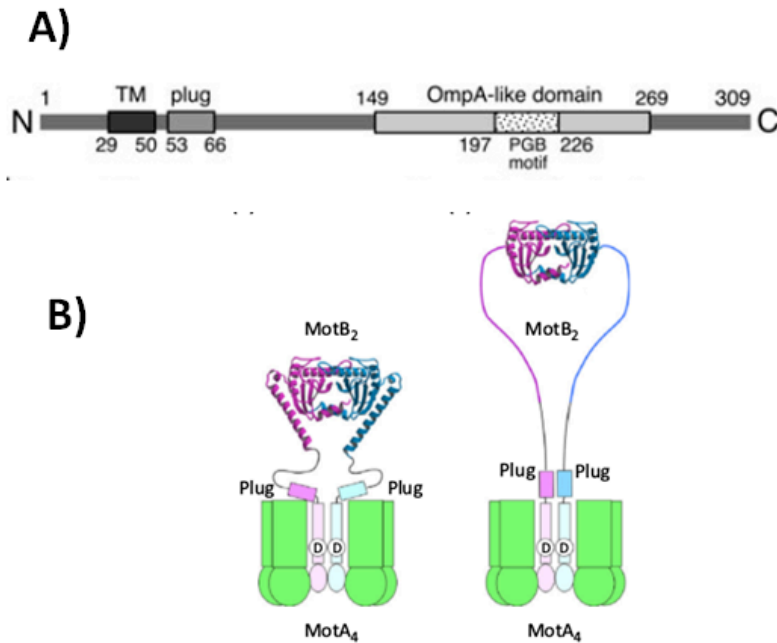


Figura 4. A) Estructura primaria de MotB donde se muestra el dominio transmembranal (residuos 30-50), la región tapón (53-66) y el dominio periplásmico que incluye al dominio de unión a la pared de peptidoglicano (197-226). B) Modelo del mecanismo inactivo incorporación y activación del estator (Kojima *et al.*, 2009; Minamino e Imada, 2015).

BIOSÍNTESIS FLAGELAR

La biosíntesis flagelar representa para la bacteria un alto costo energético. Por lo que la expresión y síntesis de los componentes flagelares está sujeta a distintos niveles de control, asegurando así que los genes requeridos durante la última etapa de la biosíntesis no puedan ser transcritos antes del ensamblaje de las estructuras tempranas (Tsang y Hoover, 2014). Los genes flagelares están organizados en múltiples operones y su expresión puede agruparse en tres categorías o clases, expresión inicial, media y tardía. Clase I, II y III, respectivamente. Los primeros genes en la jerarquía codifican para proteínas regulatorias que controlan la expresión del resto de los genes del regulón flagelar. La expresión de los genes posteriores (genes medios), incluyen componentes

estructurales del cuerpo basal, el sistema de exportación tipo III, y finalmente los genes tardíos incluyen los componentes del filamento, sistemas estatores y componentes quimiosensores (Aldridge y Hughes, 2002).

En *E. coli* y *S. enterica*, en lo alto de la jerarquía se encuentran los genes *flhDC*, la expresión de este depende directamente del AMPc-CAP (Katsukake, 1997). Las proteínas FlhC y FlhD actúan conjuntamente con el factor σ^{70} para activar los genes de clase II. A esta clase pertenecen los genes que codifican para algunos componentes del cuerpo basal, del aparato de exportación, del anillo C, así como el gancho y dos proteínas regulatorias, el factor anti-sigma, FlgM, y σ^{28} o FliA. Este factor sigma es responsable de la expresión de los genes de clase III entre los que se encuentran, la flagelina, los genes del estator y del sistema quimiotáctico.

Los pasos de la morfogénesis flagelar se muestran esquematizados en la figura 5. Este proceso inicia con el ensamblaje del anillo MS, un anillo de aproximadamente 25 nm, constituido por la proteína FliF. Esta estructura es capaz de localizarse en ausencia de cualquier otro componente flagelar (Katayama *et al.*, 1996) y su localización determina la localización de las estructuras posteriores. De acuerdo con algunos autores, se piensa que tanto el anillo MS y el aparato de exportación tipo III se ensamblan de manera coordinada (Kihara *et al.*, 2001). La segunda estructura en ensamblarse es el anillo C, constituido por las proteínas FliG, FliM y FliN. Esta estructura se localiza en la base del flagelo y su ensamblaje comienza por la interacción de la proteína FliG con FliF. Posteriormente, se incorporan las proteínas FliM y FliN. Estas proteínas son elementos importantes que responden a las señales del sistema quimiotáctico y que controlan el cambio en la dirección de rotación. Es por ello que al anillo C también se le denomina “switch complex” (Lloyd *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1998).

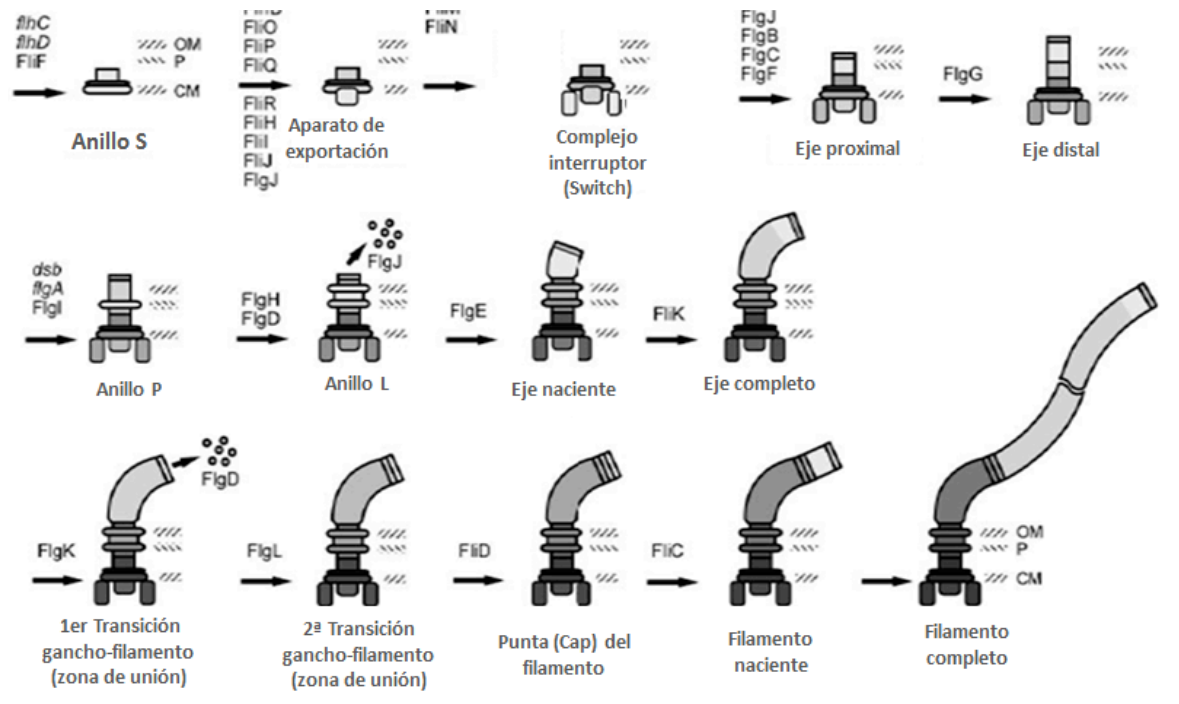


Figura. 5 Morfogénesis del flagelo de *Salmonella*. Se indican los principales pasos que inician con la formación del anillo MS. Seguido del aparato de exportación tipo III, y el anillo C. Posterior al ensamblaje del anillo C, se comienzan a exportar las proteínas axiales que conforman el eje, gancho y filamento. Las subunidades de anillo P y L son exportadas por la vía SEC. Modificado de Macnab, 2003.

A partir del ensamblaje del anillo C, con excepción de las proteínas que conforman los anillos L y P, el resto de los componentes flagelares se exportan hacia el espacio periplásmico mediante el sistema de exportación tipo III. Este sistema consiste de seis proteínas de membrana interna; FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR y tres proteínas citoplásmicas. FliH, FliI, FliJ (Minamino y Macnab 1999). Como se observa en la figura 6, las proteínas transmembranales se integran en un poro de alrededor de 2 nm de diámetro (Yonekura *et al.*, 2000) localizado al centro del anillo MS (Aizawa, 1996). Por lo que se piensa que la exportación de las proteínas axiales del flagelo, ocurre en su conformación no plegada o parcialmente plegada (Erhardt *et al.*, 2010).

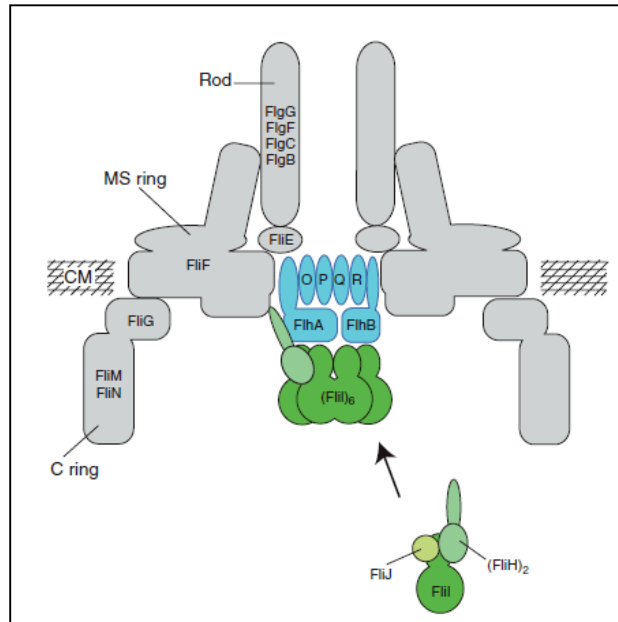


Figura 6. Esquema del sistema de exportación tipo III. FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR son proteínas de membrana interna. FliI es una proteína de la familia de ATPasa. FliH, FliI y FliJ son proteínas con función de chaperonas. FliI forma un heterotrímero junto con FliH en el citoplasma. Modelo tomado de Erhardt *et al.*, 2010.

Posterior a la conformación funcional del aparato de exportación, La proteína FliE es el primer componente en ser exportado (Macnab, 2003) y se propone como el adaptador que une la estructura del eje al anillo MS (Cohen y Hughes, 2014). Con ello inicia el ensamblaje de la estructura del eje. La cual requiere de la exportación de cuatro componentes: FlgB, FlgC FlgF y FlgG (Homma *et al.*, 1990). La evidencia experimental ha demostrado que estas cuatro proteínas deben estar presentes para que ocurra el ensamblaje del eje; de lo contrario, el eje no podrá ser ensamblado (Kubori *et al.*, 1992). La porción proximal del eje está formada por las proteínas FlgB, FlgC y FlgF, con aproximadamente 6 subunidades de cada una (Jones y Macnab 1990). Posteriormente, FlgG comienza a polimerizarse para formar la parte distal del eje. De acuerdo con la evidencia experimental (Erhardt *et al.*, 2010) la proteína FlgJ, mediante su dominio N-terminal, favorece la polimerización de las subunidades de FlgG. Mientras que el dominio C-terminal tiene actividad muramidasa, importante para formar un hueco en la

pared de peptidoglicano y permitir la elongación del eje a través de ésta. Alrededor de 26 subunidades constituyen al eje distal, formando una estructura de 11 nm de longitud aproximadamente (Chevance *et al.*, 2007).

Posterior a que el eje distal se ha completado, se requiere de la apertura de la membrana externa para dar paso al ensamblaje de los componentes extracelulares gancho-filamento. Para que este proceso ocurra, se requiere de la incorporación de las proteínas FlgA, FlgH y FlgI, que son componentes secretados por la vía SEC (sistema de exportación tipo II). FlgI forma el anillo P cuyo ensamblaje es facilitado por la proteína FlgA (Jones *et al.*, 1989). La proteína FlgH forma el anillo L en la membrana externa, el cual que permite el paso del flagelo en formación (Cohen y Hughes, 2014). Recientemente ha sido propuesto que la formación de este anillo es necesaria para la remoción de FlgJ de la punta del eje, y así ser reemplazado por la proteína FlgD, necesaria para la formación del gancho, ya que asiste con el plegamiento e incorporación de las subunidades de FlgE (fig. 7) (Cohen y Huges, 2014).

La polimerización de las subunidades del gancho constituyen una estructura de un tamaño aproximado a los 55 nm. El tamaño está regulado por la proteína FliK mediante un mecanismo aún poco caracterizado (Patterson *et al.*, 1973; Hirano *et al.*, 1994).

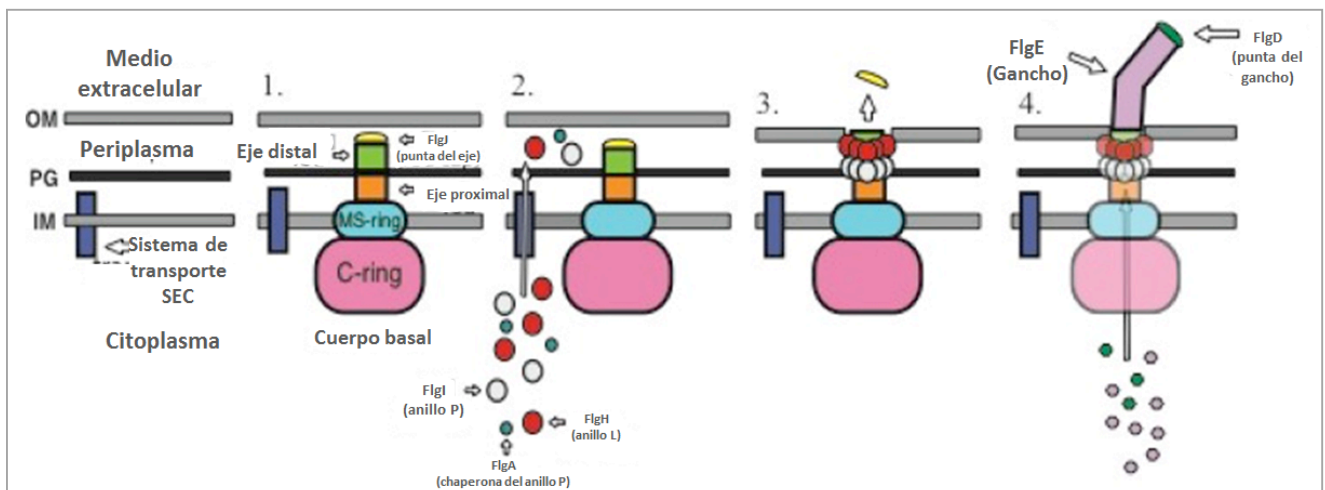


Figura 7. Modelo de ensamblaje del flagelo, transición de eje a gancho (Cohen y Huges, 2014). El primer paso requiere del ensamblaje del anillo MS en la membrana

interna y del anillo C en el citoplasma. La exportación de las proteínas FliE, FlgB, FlgC y FlgF permite la formación del eje proximal. Seguido de la incorporación de FlgJ que ayuda a la polimerización del eje distal conformado por la proteína FlgG. El tamaño aproximado del eje es de 22 nm. En este punto, el eje perpendicular a la membrana externa, donde el anillo L, conformado por FlgH, permite la apertura de la membrana externa y la dislocación de la proteína FlgJ hacia el espacio extracelular, lo que da lugar a la subsecuente formación del gancho.

Una vez que el gancho y el cuerpo basal han sido ensamblados, el último paso en la biosíntesis flagelar requiere de la secreción del factor anti- σ^{28} (FlgM) al medio extracelular (Hughes *et al.*, 1993); este evento permite la expresión de los genes flagelares tardíos, los cuales incluyen la flagelina, el último componente estructural del flagelo. Para que ocurra la polimerización del filamento, es necesario que la proteína FliD se posicione en la punta del flagelo en formación y se estructure como un pentámero que permite el ensamblaje de las subunidades de flagelina (Macnab, 2003; Chevance y Hughes, 2008).

Diversidad estructural del cuerpo basal flagelar

El flagelo es actualmente un paradigma de la biología molecular por lo que la caracterización de nuevos componentes flagelares aporta evidencia para interpretar el proceso evolutivo y proponer la forma en cómo las bacterias han ido adaptado los motores flagelares a su estilo de vida (Chen *et al.*, 2011).

Estructuralmente se ha descrito un modelo flagelar compuesto por estructuras comunes en todos los flagelos de bacterias. El eje, anillos L, P, MS, C, y aparato de exportación forman parte de esta estructura y lo constituyen entre 20 y 24 proteínas distintas (Zhu *et al.*, 2017). Dada su presencia ubicua, a esta estructura se le denomina núcleo o centro (core).

Las técnicas de aislamiento y observación mediante microscopía electrónica, de los cuerpos basales del flagelo, aunado al análisis genético y bioquímico han permitido

visualizar y caracterizar estructuras adicionales en el motor de *Vibrio* spp. (Terashima *et al.*, 2006). Posteriormente, la visualización de los motores flagelares *in situ* a partir de imágenes obtenidas por criotomografía electrónica, han permitido comparar y hacer evidentes nuevas estructuras flagelares alrededor de la estructura núcleo (fig. 8), estos nuevos elementos están presentes en aquellas especies de bacterias conocidas por alcanzar altas velocidades de nado y poseer motores con mayor torque (Kaplan *et al.*, 2019).

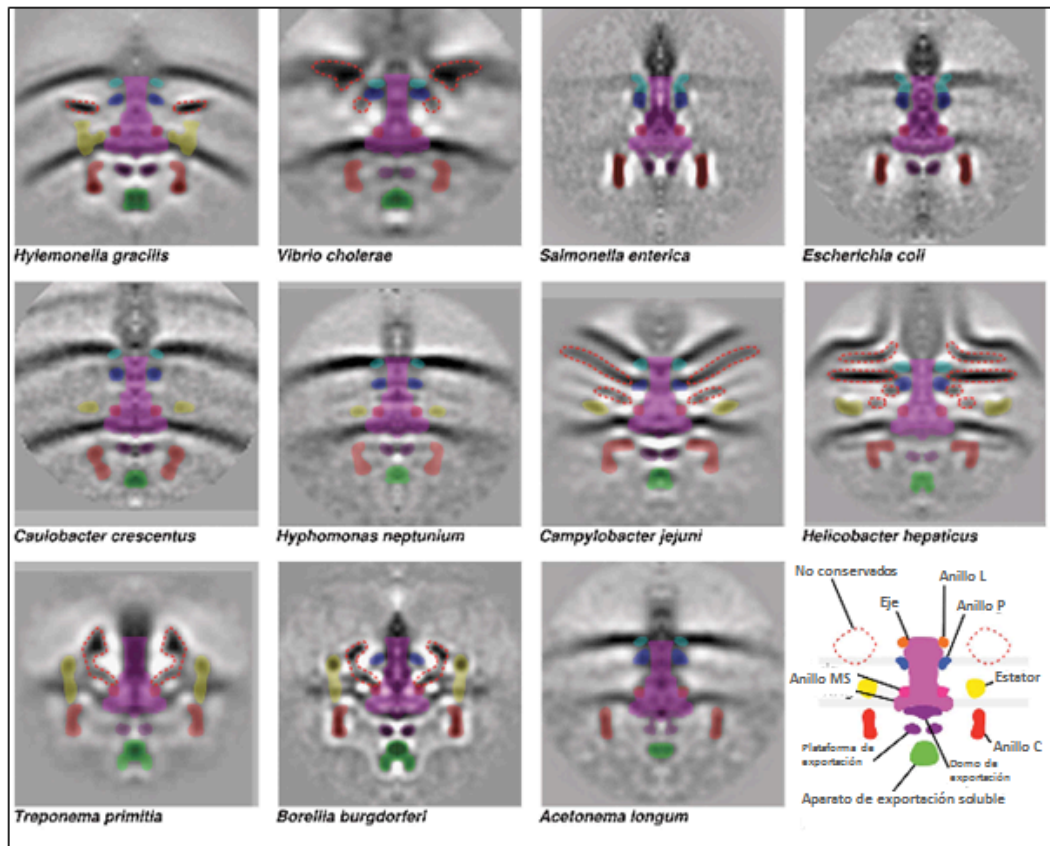


Figura 8. Reconstrucción de imágenes de criotomografía, obtenidas de varios motores flagelares de distintas especies de bacterias. Los colores del modelo de la parte inferior derecha, señalan las estructuras conservadas, que corresponden al aparato de exportación (verde), anillo C (rojo) anillo MS (rosa) estatores (amarillo) eje (morado) anillo P y anillo L (azul y anaranjado, respectivamente). Las líneas punteadas señalan estructuras no conservadas entre las diferentes especies. Tomado de Chen *et al.*, 2011.

El motor flagelar de *Vibrio* spp.

Una de las características del sistema flagelar de *Vibrio alginolyticus* es su capacidad para alternar entre un solo flagelo de ubicación polar, que emplea para nadar en medios completamente líquidos, o varios flagelos peritricos, cuando la viscosidad del medio aumenta. El motor flagelar de esta especie es capaz de rotar a una velocidad máxima de 1700 Hz, comparado con el motor de *S. enterica* que rota 300 Hz (Minamino e Imada 2015).

La fuente de energía que alimenta al motor de *Vibrio* spp. proviene del gradiente de Na^+ y a diferencia del motor de *Salmonella* que tiene un sistema estator conformado por MotA/MotB, los estatores de *Vibrio* están conformados por las proteínas homólogas PomA/PomB (fig. 9) (Asai *et al.*, 1997).

La estructura del cuerpo basal flagelar de diferentes especies de *Vibrio*, incluye dos anillos adicionales que no están presentes en el motor de *S. enterica*, el anillo H y el anillo T que rodean a los anillos L y P (fig. 9) (Hosogi *et al.*, 2011).

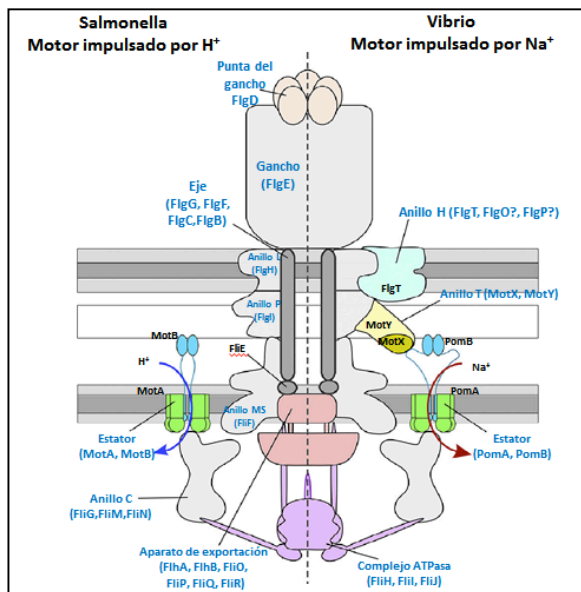


Figura 9. Esquema de la arquitectura del cuerpo basal. Izquierda, cuerpo basal flagelar de *S. enterica*, lado derecho cuerpo basal flagelar de *Vibrio*. El esquema muestra los componentes adicionales del motor de *Vibrio* que corresponden al anillo T (MotX/MotY) y el anillo H (FigT). El modelo está basado en imágenes de microscopía electrónica. Tomado de Minamino e Imada, 2015.

Se ha propuesto que la presencia del anillo H, conformado principalmente por la proteína FlgT, es responsable de mantener anclado el flagelo a la célula, ya que las cepas carentes de este anillo muestran una flagelación disminuida, mientras aumenta la cantidad de flagelina en el medio de cultivo. (Martinez *et al.*, 2010; Merino y Tomás 2016). Estudios adicionales demostraron que el anillo H es necesario para la formación del anillo T, conformado por las proteínas MotX y MotY (fig. 9) (Terashima *et al.*, 2010).

El análisis de distintas versiones truncas de FlgT demostró que la región media de FlgT interactúa con la proteína MotY y de este modo induce la formación del anillo T. Además, se propone que la región carboxilo terminal de MotY se asocia a la pared de peptidoglicano, mientras que la porción amino terminal (MotY-N) es responsable de la interacción con MotX y con la región media de FlgT (Terashima *et al.*, 2010). La función de la proteína MotX consiste en reclutar a los estatores mediante la interacción entre MotX y PomB (Okabe *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia del anillo T es clave para el reclutamiento de los estatores.

En el cromosoma de *Vibrio cholerae* también fue identificado el marco de lectura que codifica para la lipoproteína FlgP. El papel de esta proteína está relacionado con la motilidad, ya que cepas carentes de FlgP muestran una población en la que más del 80% de las células son incapaces de nadar. No obstante el 41% de la población tiene flagelo, lo que llevó a postular que FlgP era necesaria para el ensamblaje de un flagelo estable (Morris *et al.*, 2008 y Martinez *et al.*, 2009).

Imágenes de criotomografía electrónica del flagelo de *Vibro fischeri* demostraron que la falta de la proteína FlgP impide la formación de un componente ubicado por debajo de la membrana externa de 28 nm de diámetro, aproximadamente. Dicha estructura fue denominada disco basal (fig. 10). En la mutante $\Delta flgP$ las únicas estructuras que pudieron ser observadas fueron el anillo MS, el eje, y los anillos L, P, H y T (Beeby *et al.*, 2016). Interesantemente, en este estudio también se observó que la ausencia del disco basal provocó una reducción de la cantidad de estructuras gancho/filamento presentes en la población. A partir de estos resultados fue postulado que la proteína FlgP forma el disco basal en *Vibrio fischeri*.

Recientemente fue publicada evidencia que reveló la presencia de flagelos periplásmicos en las células de *V. alginolyticus* carentes de FlgT, así como de otra

proteína denominada FlgO. La proteína FlgO es una proteína presente en un reducido número de bacterias (i.e. *Vibrio* y *Arcobacter*), y ha sido caracterizada como una lipoproteína importante para la formación del flagelo (Martinez *et al.*, 2009). Las observaciones anteriores han llevado a postular que el anillo H está formado por FlgT, FlgO y quizá por FlgP, siendo las tres proteínas necesarias para una eficiente penetración de la membrana externa (Zhu *et al.*, 2018).

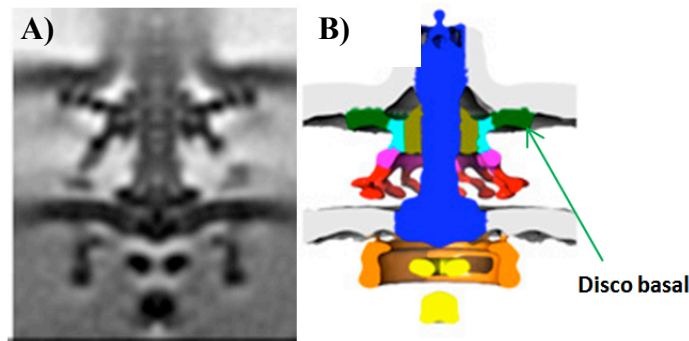


Figura 10. Reconstrucción de los cuerpos basales de A) *V. fischeri* y B) *V. alginolyticus* donde se resalta el disco basal. Imágenes obtenidas de Terashima *et al.*, 2017.

El motor de *Campylobacter jejuni*

Las condiciones de vida de las bacterias épsilon dentro de la mucosa intestinal del hospedero requieren de un flagelo altamente eficiente para poder contender con el ambiente viscoso de la mucosa intestinal. Por lo que el motor flagelar de este grupo de bacterias se ha adaptado a estas condiciones. El motor de *C. jejuni* tiene tres estructuras adicionales, denominadas; disco basal, que se localiza por debajo de la membrana externa. El disco proximal, que se encuentra adyacente a la membrana interna y finalmente el disco medio, localizado entre el disco proximal y distal (fig.11). De manera experimental y a través de la visualización de los motores flagelares *in situ*, se han explorado los componentes que conforman dichas estructuras (Beeby *et al.*, 2016).

Previamente se caracterizó el fenotipo de la delección de los genes *flgP* y *flgQ*, ambos implicados en la motilidad de la bacteria (Sommerlad y Hendrixson, 2007). Se

determinó que en ausencia de FlgP las células son capaces de ensamblar el flagelo pero que este no rota, un fenotipo similar se observó en la mutante carente de FlgQ. Posteriormente, con el uso de imágenes de criotomografía se observó que la proteína FlgP forma la estructura del disco basal con ayuda de FlgQ, se piensa que la presencia de disco basal provoca en la membrana externa una conformación en forma de embudo; y que la falta de FlgP conduce a la pérdida de los discos medio y proximal (Beeby *et al.*, 2016). El disco medio, parece estar conformado por las proteínas PflA y posiblemente FlgQ; mientras que el disco proximal, localizado por encima de la membrana interna, está conformado por la proteína PflB. La evidencia experimental sugiere que el disco proximal es esencial para la incorporación de los estatores alrededor del motor de *Campylobacter* (Beeby *et al.*, 2016).

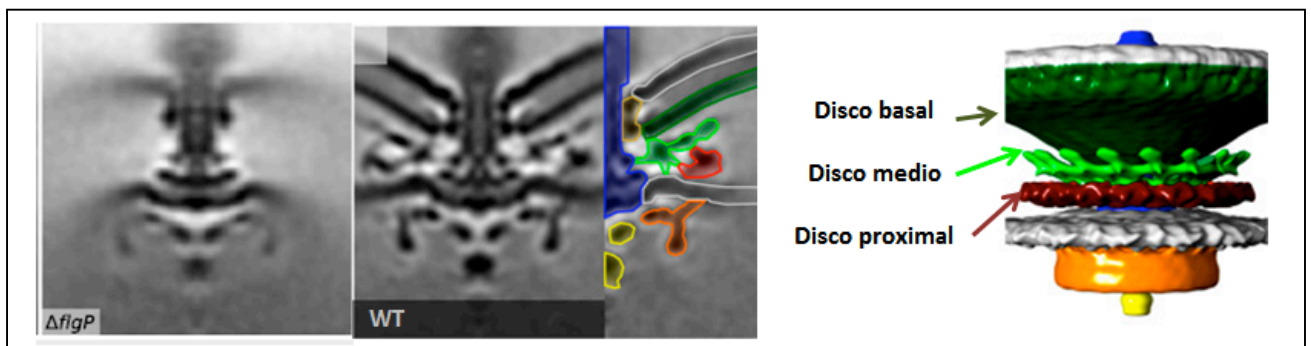


Figura 11. Estructura del motor flagelar de *Campylobacter jejuni*. Motor flagelar de la cepa silvestre, WT. B motor flagelar de la cepa $\Delta flgP$ (izquierda) la cual no ensambla ninguno de los discos observados en la WT. C) Modelo 3D del motor flagelar de *C. jejuni*, donde se representa el disco basal (verde oscuro), el disco medio (verde claro) y el disco proximal (rojo). Imágenes obtenidas mediante criotomografía electrónica, tomado de Beeby *et al.*, 2016.

El sistema flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*

R. sphaeroides es una alfa proteobacteria de vida libre y muy versátil metabólicamente. Es capaz de realizar fotosíntesis en ambientes anaeróbicos (Woese *et al.*, 1984) obtener energía a partir de la respiración y oxidación de elementos orgánicos; también es capaz de fijar CO₂ y nitrógeno (Clayton y Sistrom, 1978).

A nivel genético, *R. sphaeroides* WS8 tiene dos cromosomas CI y CII de 3.14 y 0.97 Mpb y dos plásmidos pA y pB, de 200 y 100 Kbp respectivamente. Dentro del cromosoma I, se encuentran codificados dos grupos de genes flagelares, denominados sistema flagelar Fla1 y sistema flagelar Fla2. La evidencia filogenética sugiere que el sistema Fla2 corresponde al sistema endógeno del grupo taxonómico alfa proteobacteria, mientras que el sistema Fla1 es considerado como el sistema exógeno, adquirido a partir de un evento de transferencia horizontal, proveniente del grupo taxonómico gama proteobacteria (Poggio *et al.*, 2007).

Los genes que conforman el sistema Fla1 permiten la síntesis de un solo flagelo de ubicación subpolar, mientras que los productos de los genes *fla2* dan lugar a la formación de varios flagelos polares (fig. 12) (Poggio *et al.*, 2007; De la Mora *et al.*, 2015).

Los genes *fla1* se expresan constitutivamente en las condiciones de cultivo comúnmente utilizadas en el laboratorio, mientras que los genes *fla2* se mantienen transcripcionalmente inactivos. Para lograr su expresión fue necesario el impedir la expresión de los genes *fla1* (mediante una mutación en el gen maestro *fleQ*, el cual mencionaremos mas adelante) y seleccionar cepas mutantes espontáneas que adquirieran la habilidad de nadar en ausencia del flagelo Fla1. La caracterización de estas mutantes llevó a determinar que un solo cambio en la cinasa de histidina CckA es suficiente para permitir el nado con el flagelo 2 (del Campo *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2015). Las condiciones que en la naturaleza permiten la expresión del flagelo 2 son a la fecha desconocidas.

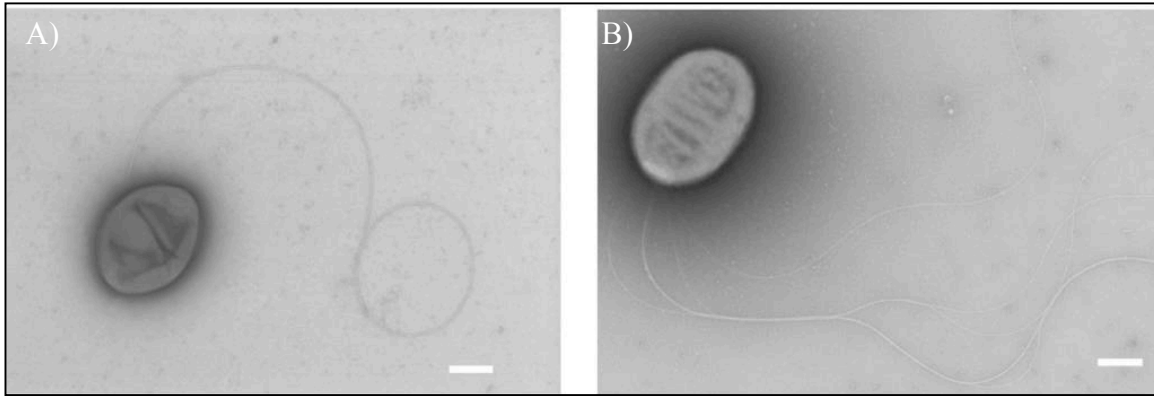


Figura 12. Micrografías de *R. sphaeroides*. A) cepa WS8, la cual expresa un único flagelo de ubicación subpolar (Fla1). B) cepa AM1 (Fla2+, Fla1-), la cual expresa múltiples flagelos ubicados polarmente en el cuerpo de la célula. Micrografía tomada de De la Mora *et al.*, 2015.

La regulación de los genes *fla1* se da bajo un patrón de expresión jerárquico que posee cuatro niveles o clases (fig. 13) (Poggio *et al.*, 2005).

En el primer nivel de expresión, se ubica el gen que codifica para el regulador maestro FleQ, esta proteína forma un complejo con el factor σ^{54} para llevar a cabo la expresión de los genes de clase II. En esta clase se encuentran los genes del operón *fleT* conformado por *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI* y *fliJ*.

La proteína FliE forma la interfase entre el anillo MS y el eje, mientras que *fliG*, *fliH*, *fliI* y *fliJ* son elementos del aparato de exportación tipo III. La importancia de este operón, además de contener a los genes cuyos productos dan lugar a las estructuras tempranas del flagelo, estriba en la expresión del gen *fleT*. FleT es una proteína activadora del factor σ^{54} , y con FleQ forma un heterooligómero, necesario para activar la transcripción de los genes de clase III. En esta clase se encuentran los genes cuyos productos son necesarios para la formación del eje (FlgB, FlgC, FlgE, FlgG), gancho (FlgE), el resto de los elementos del aparato de exportación (FliO, FliQ, FliR), así como el factor σ^{28} (FliA) y su factor anti σ^{28} , FlgM. Es importante mencionar que los genes *motA* y *motB* también son expresados como parte de los genes de clase III. En contraste con *E. coli* y *S. enterica* en donde *motA* y *motB* se expresan conjuntamente con la flagelina, esto es, en el último nivel de la jerarquía (Macnab, 2003).

Finalmente, el cuarto nivel de expresión requiere de la actividad del factor σ^{28} . Para ello, se requiere previamente de la liberación del factor antisigma, codificado por el gen *flgM*; el cual es liberado al medio extracelular una vez que la estructura del gancho ha sido ensamblada. El factor σ^{28} permite la expresión de *fliC*, y de los genes *fliD* y *fliS*. Durante este nivel de expresión, también son transcritos algunos genes involucrados en la señalización quimiotáctica, entre ellos el gen *cheY4* (Hernandez *et al.*, 2017).

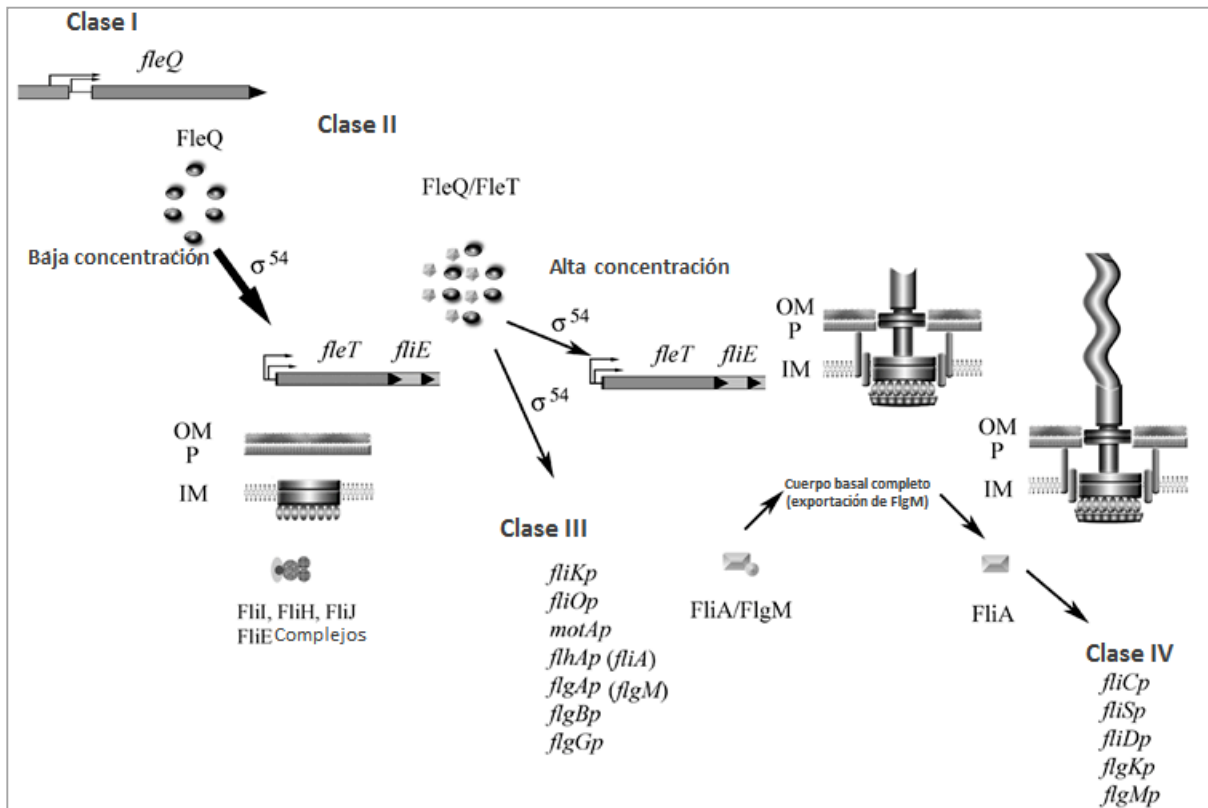


Figura 13. Jerarquía de expresión de los genes *fla1* de *R. sphaeroides*, en ella se expresan los genes en cuatro clases bajo el control del regulador maestro FleQ. Tomada de Poggio *et al.*, 2005.

Particularidades del sistema Fla1 de *R. sphaeroides*

El grupo flagelar 1 de *R. sphaeroides* contiene los genes requeridos para ensamblar un flagelo muy parecido al sistema de *E. coli* o *S. enterica*. Sin embargo, a diferencia de los

múltiples flagelos que sintetiza el sistema flagelar de *E. coli*, el sistema Fla1 de *R. sphaeroides* ensambla un solo flagelo de ubicación subpolar que rota unidireccionalmente en sentido de las manecillas del reloj (CW). La trayectoria de corrida de *R. sphaeroides* en medio líquido es interrumpida por breves episodios de paro, lo que le permite a la bacteria reorientarse hacia su estímulo mediante el movimiento Browniano. Ha sido propuesto que, durante los episodios de paro, el flagelo es capaz de mantener una frecuencia de rotación mínima, lo que permite reorientar a la bacteria eficientemente (Armitage *et al.*, 1999).

Entre los componentes únicos o poco caracterizados presentes en el flagelo de *R. sphaeroides*, destacan las proteínas FliL, FlgT, MotF y la proteína que es objeto de este trabajo, FlgP.

La proteína FliL es una proteína con un cruce transmembranal en el extremo N-terminal y se localiza en la estructura flagelar (Suaste *et al.*, 2010). La distribución de esta proteína en los diferentes grupos bacterianos es amplia, lo que hace suponer que cumple un papel relevante para la formación o funcionamiento del flagelo. En *Salmonella*, FliL fue copurificada al aislar los cuerpos basales flagelares (Schoenhals y Macnab, 1999); sin embargo, la ausencia de FliL no afectó el nado de la bacteria (Raha y Macnab, 1994). Se han reportado múltiples fenotipos asociados a la pérdida de FliL en distintas especies. En *Caulobacter crescentus*, *Silicibacter* TM1040 y *R. sphaeroides*, la ausencia de FliL genera un fenotipo Mot- (las células ensamblan flagelo pero son incapaces de rotarlo (Jenal *et al.*, 1994; Belas *et al.*, 2009; Suaste *et al.*, 2010). En *Pseudomonas putida* fue reportado que la ausencia de FliL provoca que las bacterias sean incapaces de ensamblar el flagelo, fenotipo Fla- (Segura *et al.*, 2001). En *R. sphaeroides* fueron aisladas mutaciones supresoras que permitían el nado de las cepas mutantes en *fliL*, y todas las mutantes caracterizadas mapearon en la región del tapón de MotB. Además en las ocho mutantes el cambio redujo la hidrofobicidad de la hélice anfipática. Estos resultados sugirieron que FliL es importante para activar la apertura del canal de protones, y con ello la estabilidad de los estatores (Suaste, 2010).

Estudios recientes en *V. alginolyticus* (motor dependiente de protones) han corroborado que FliL se localiza en la base del flagelo y que su asociación depende de la presencia de los complejos estatores, y a su vez la ausencia de FliL reduce el

reclutamiento de los complejos estatores (Zhu *et al.*, 2017). Utilizando este mismo microorganismo, experimentos de microscopia de fluorescencia de una sola partícula, revelaron que FliL posee una estequiometría de 1:1 con respecto a los complejos estatores. Además se determinó que la ausencia de la región del tapón de MotB provocó una reducción en la localización de FliL (Lin *et al.*, 2018) En marzo de 2019 fue reportada la estructura cristalina del dominio periplásmico de FliL de *V. alginolyticus*, se observó que éste muestra una similitud estructural con el dominio de estomatina/prohibitina, presente en las proteínas de la familia de las estomatinas. Aunque la función de la mayoría de los miembros de esta familia de proteínas no se conoce, algunas de ellas han sido implicadas en el control de canales iónicos en diversos organismos (Brand *et al.*, 2012; Genetet *et al.*, 2017). En el cristal, el dominio periplásmico de FliL multimeriza en forma de un cilindro de 12 subunidades, el cual tiene un diámetro interior de 8 nm, el cual podría ser ocupado por la región periplásmica de MotB (Takekawa *et al.*, 2019).

Otro componente importante para la motilidad de *R. sphaeroides* es MotF. Una proteína cuyos homólogos se encuentran únicamente en ciertas especies de la familia Rhodobacteraceae. MotF es una proteína transmembranal que posee un largo dominio periplásmico (aa. 75-239). La ausencia de esta proteína no afecta la formación del flagelo. Sin embargo, elimina la capacidad de nado de la bacteria. La caracterización de MotF en el flagelo de *R. sphaeroides*, demostró que el dominio periplásmico de MotF es capaz de interactuar con la proteína que forma el anillo H (FlgT) pero no con MotB. No obstante, la influencia de los componentes del motor FliL y MotB sobre MotF se observó utilizando la fusión GFP-MotF, ya que esta versión de la proteína muestra un patrón de localización alterado en las mutantes *fliL* y *motB*, sugiriendo que la presencia de estas dos proteínas indirectamente favorece o estabiliza a MotF en el motor flagelar (Ramírez *et al.* 2012; Fabela *et al.*, 2013).

En secciones anteriores fue descrito el anillo H presente en los motores flagelares de bacterias como *V. alginolyticus* y *C. jejuni*. La proteína FlgT es esencial para la

formación de este anillo y fue inicialmente caracterizada en *V. alginolyticus* como un componente exclusivo de las bacterias con motores dependientes de Na⁺ (Minamino e Imada, 2015). La baja similitud de FlgT con su homólogo de *R. sphaeroides* impidió que este último pudiera ser identificado mediante comparaciones tipo BLAST. En *R. sphaeroides* se identificó la proteína homóloga a FlgT, la cual al igual que en el flagelo de *Vibrio* sp, es capaz de ensamblar un anillo de alrededor de 60 nm, que rodea a los anillos L y P del flagelo de *R. sphaeroides* (fig. 14). Con ello, se reportó por primera vez, la presencia de FlgT y del anillo H, en una bacteria impulsada por H⁺, como lo es *R. sphaeroides*.

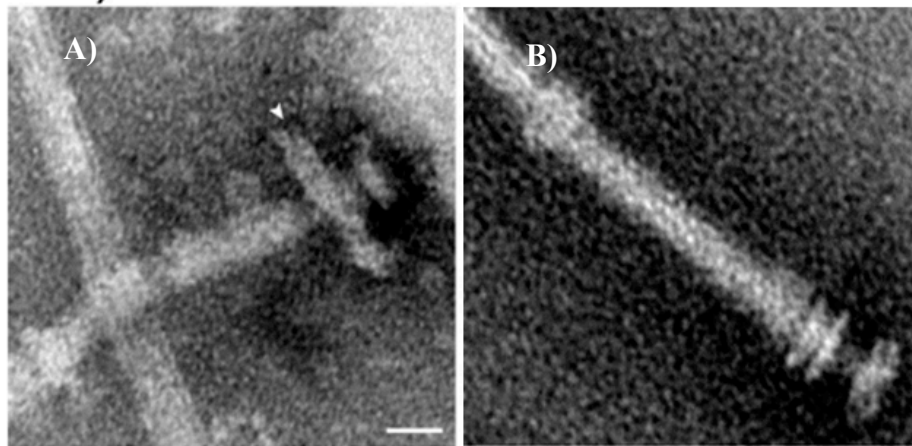


Figura 14. Micrografía electrónica de los cuerpos basales del flagelo de *R. sphaeroides* aislados a partir de la cepa silvestre WS8 (A) y de la cepa mutante $\Delta flgT$ (B). A) La flecha blanca señala la estructura del anillo H, conformado por FlgT. B) En ausencia de FlgT se pierde la estructura del anillo H. Tomado de Fabela *et al.*, 2013.

Se demostró que FlgT es indispensable para la rotación del flagelo, probablemente favoreciendo el reclutamiento de los estatores, ya sea de forma directa o indirecta, dado que se ha observado que esta proteína es capaz de interactuar con MotB, MotF y FliL (Fabela *et al.*, 2013).

El flagelo de *R. sphaeroides* posee todos los componentes presentes en el flagelo de *E. coli* y *S. enterica*; sin embargo, la evidencia experimental ha demostrado que tiene otros componentes importantes para su función como son las proteínas FlgT, FliL y MotF. Por lo tanto, resulta importante caracterizar los marcos de lectura de función desconocida presentes en el locus *fla1* de *R. sphaeroides*. Por lo anterior, la presente investigación se centra en la caracterización del marco de lectura RSP_0035 localizado en el grupo flagelar 1 de esta bacteria.

Hipótesis

RSP_0035 codifica para un componente flagelar necesario para la biogénesis y/o rotación del flagelo de *R. sphaeroides* WS8.

Objetivo particular

Caracterizar el papel que cumple la proteína codificada por RSP_0035 en *R. sphaeroides* WS8.

Objetivos generales

Obtener una cepa mutante en el gen *RSP_0035* en la cepa *R. sphaeroides* WS8. y evaluar su capacidad de nado en medio líquido y agar suave.

Evaluar si la proteína forma parte del flagelo de *R. sphaeroides*.

Evaluar si la proteína es capaz de interactuar con otros componentes flagelares de *R. sphaeroides* WS8.

Resultados

En *R. sphaeroides* WS8 el marco de lectura RSP_0035 ocupa la primera posición de un operón de 5 cistrones: *0035*, *flgT*, *flgA*, *flgM* y *RSP_6087*. De estos genes se sabe que *flgT* codifica para el componente estructural del anillo H del cuerpo flagelar (Fabela *et al.*, 2013). FlgA se ha propuesto como una proteína que asiste el plegamiento de la proteína del anillo P, FlgI en *S. enterica* (Nambu y Kutsukake, 2000; Matsunami, *et al.*, 2016). El producto del gen *flgM* regula la actividad transcripcional del factor σ^{28} . El marco de lectura RSP_6087 no ha sido implicado en el funcionamiento del sistema flagelar.

RSP_0035 codifica para una proteína de 177 residuos, que en la región N-terminal posee una secuencia denominada como “lipo-box”, conformada por los residuos Leu-Ala-Ala-Cys-Ala en la posición 18 a 22, respectivamente. Dicha secuencia es reconocida por la peptidasa II (SPasall) y procesada entre la Ala20 y Cys21. Ya que la posición +2 es ocupada por Ala, la predicción indica que esta proteína corresponde a una lipoproteína de membrana externa (fig. 15) (Juncker *et al.*, 2003; Seydel *et al.*, 1999).

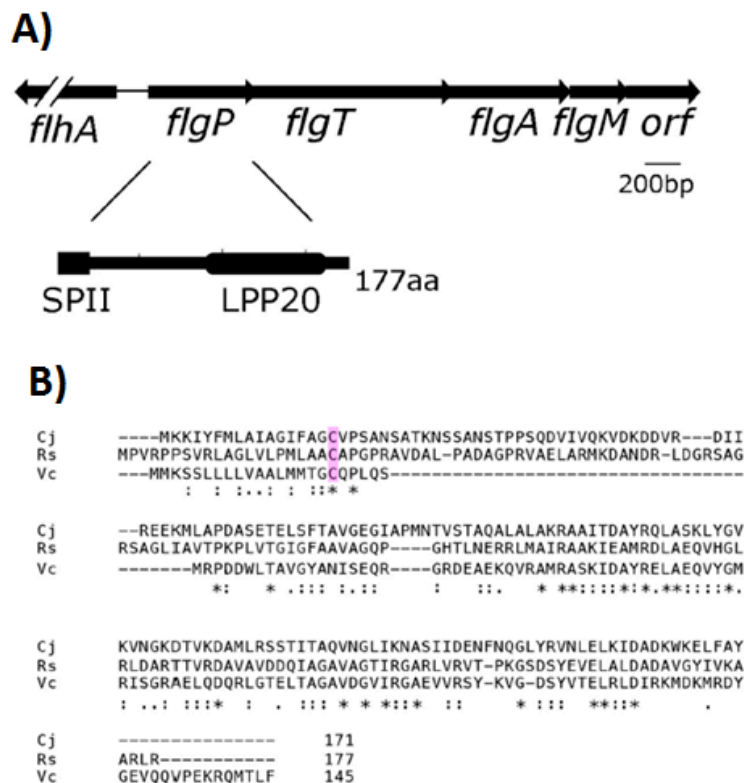


Figura 15. A) Mapa del operón que incluye el marco de lectura abierto *flgP*. El acercamiento muestra el polipéptido codificado por *flgP*, cuyo producto corresponde a 177 aa. SPII señala el sitio de reconocimiento de la proteasa II (SPII) en la región lipobox, presente entre los residuos 18-22. LPP20, corresponde a la región conservada de la familia de lipoproteína LPP20 (residuos 73-163) b) Alineamiento de las secuencias de

FlgP de *R.s* con sus homólogos de *C. jejuni* y *V. cholerae*. En rosa el residuo de cisteína conservado en la secuencia lipo-box.

Se llevaron a cabo alineamientos utilizando BLAST_P, e identificamos en el genoma de *Vibrio cholerae*, y *Campylobacter jejuni*, una secuencia homóloga al producto de RSP_0035, denominada FlgP. Los porcentajes de similitud calculados a partir de este análisis fueron del 25%, y 27% respectivamente. Con este resultado, renombramos al marco de lectura RSP_0035 como FlgP (fig. 15).

Para caracterizar el papel de FlgP en el flagelo de *R. sphaeroides*, generamos la cepa mutante, denominada $\Delta flgP::aadA$ La cual lleva interrumpido al gen *flgP* con un casete de resistencia a espectinomicina, *aadA*. Dicho casete de resistencia solamente incluye la región codificadora del gen de resistencia y su promotor, las secuencias terminadoras han sido eliminadas de éste (Ballado *et al.*, 2001). Evaluamos la capacidad de nado de la cepa obtenida, y observamos que la población de células es incapaz de nadar tanto en cultivos líquidos como en cajas de agar suave (fig. 16A). Buscamos restituir el fenotipo de nado de la cepa $\Delta flgP::aadA$ mediante la expresión del alelo silvestre *flgP* utilizando el plásmido de expresión pRK415. Sin embargo, no fue posible recuperar el fenotipo silvestre (fig. 16). La presencia de FlgP fue probada mediante un ensayo de Western blot, utilizando extractos celulares de la cepa $\Delta flgP/pRK$ -FlgP. Como se observa en la fig. 16B se puede confirmar la presencia de la proteína FlgP en la cepa conjugada ($\Delta flgP/pRK$ -flgP).

Para restaurar el defecto de nado de la cepa $\Delta flgP$, se requirió el expresar conjuntamente a los genes *flgP* y *flgT* utilizando el plásmido pRK-*flgP*-*flgT* (fig. 16B). El resultado de este experimento nos llevó a considerar que la mutación en *flgP*, afectó la expresión del gen *flgT*, por lo que llevamos a cabo experimentos de Western blot para evaluar su expresión. El resultado reveló la ausencia de FlgT en la cepa $\Delta flgP::aadA$ (fig. 16B). Sin embargo, para demostrar que la expresión de FlgT no es capaz de restaurar el fenotipo causado por la mutación en *flgP*, procedimos a expresar en *trans* a *flgT* como único producto en el plásmido pRK-*flgT*. Dicho plásmido permitió la acumulación de FlgT en la cepa $\Delta flgP$ a un nivel similar al detectado en la cepa silvestre (fig. 16B). Sin

embargo, la expresión de *flgT* no fue suficiente para recuperar la capacidad de nado de la cepa $\Delta flgP$ (fig. 16A). Los resultados anteriores en conjunto indican que la ausencia de la proteína FlgP es la razón de la incapacidad de nado en la cepa mutante. A partir de los resultados anteriores fue clara la necesidad de introducir un plásmido que expresara *flgT* en la cepa mutante en *flgP*, con el fin de descartar los efectos que la ausencia de FlgT pudiera causar.

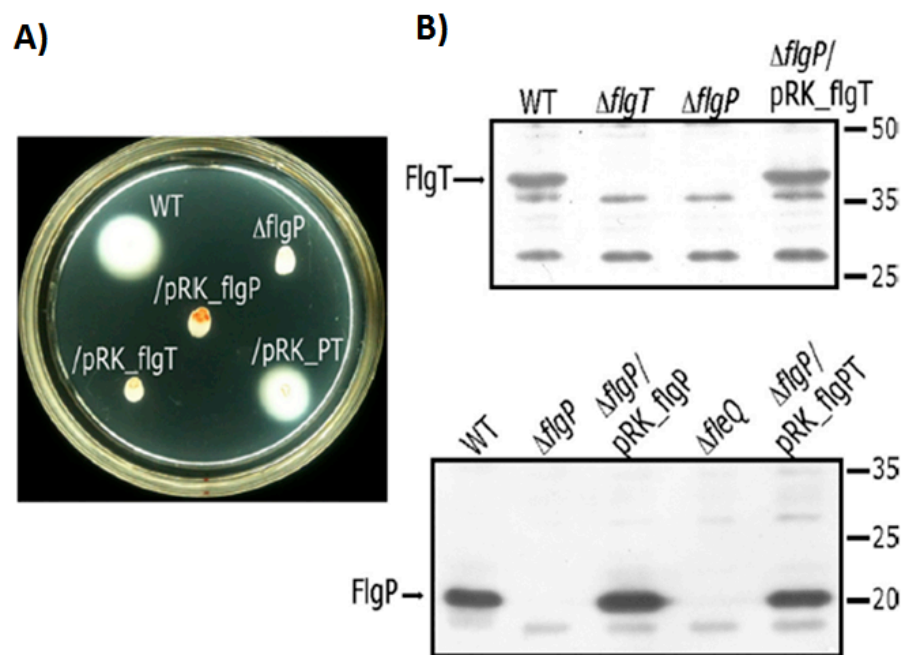


Figura 16. A) Caja de nado 0.2% agar, inoculada con la cepa silvestre WS8, la cepa mutante $\Delta flgP$, y la cepa $\Delta flgP$ conjugada con los plásmidos indicados en la figura, i.e pRK-*flgP*, pRK-*flgT*, y pRK-*flgP-flgT*; en todos los plásmidos el o los genes corresponden al alelo silvestre y son expresados a partir del promotor *lac* presente en el plásmido pRK415. B) Inmunodetección de FlgP y FlgT en extractos totales de las cepas indicadas.

Con el fin de determinar si el fenotipo paralizado de la cepa $\Delta flgP$, fue debido a la incapacidad para rotar el flagelo (fenotipo Mot⁻), o debido a la incapacidad para ensamblarlo (fenotipo Fla⁻), procedimos a teñir con DAPI las células de la cepa $\Delta flgP$, así como otras cepas que nos sirvieron como controles.

Las imágenes del microscopio demostraron que en la cepa silvestre WS8, la mayoría de las células mantienen la estructura del filamento unido al cuerpo de la bacteria (fig. 17) Contrario a este resultado, observamos que la población de células $\Delta flgP$ no parecen tener flagelos unidos, así como tampoco se observaron flagelos desprendidos en la laminilla (fig. 17).

Adicionalmente demostramos que a pesar de expresar en *trans* la secuencia *flgT* en la cepa $\Delta flgP$, esta no restaura la capacidad para ensamblar al filamento, manteniendo el fenotipo de la cepa parental Fla⁻ (fig. 17). Sin embargo, al expresar la proteína FlgP en la cepa mutante $\Delta flgP$, esta fue capaz de recupera la capacidad para ensamblar la estructura del filamento, produciendo un fenotipo equivalente al de la cepa $\Delta flgT$ (fig. 17) (Fabela *et al.*, 2013). Este resultado confirma la ausencia de la proteína FlgT en la cepa $\Delta flgP$. Además, podemos afirmar que la ausencia del filamento en la cepa $\Delta flgP$ es debido a la falta de la proteína FlgP y no de FlgT (Fabela *et al.*, 2013). Por lo tanto, concluimos que la mutación del gen *flgP* en *R. sphaeroides* provoca fenotipo Fla⁻.

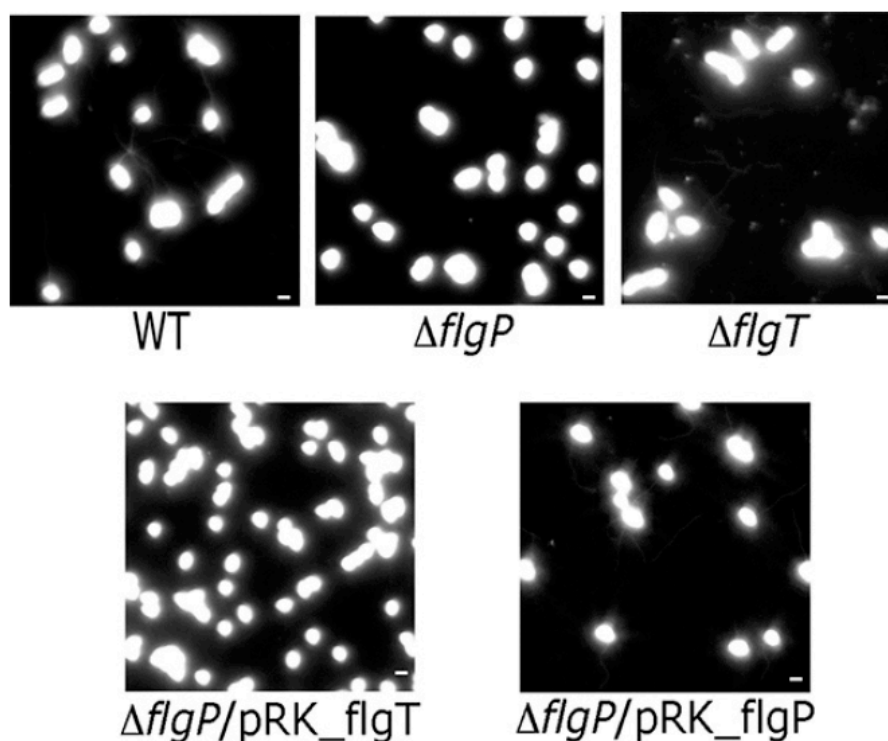


Figura 17. Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia representativas de la cepa silvestre, WS8, la cepa $\Delta flgP$ y la cepa $\Delta flgT$ en la parte superior de la figura. La

mutante $\Delta flgP$ complementada con los plásmidos indicados se muestra en la parte inferior. Las células fueron teñidas con el compuesto fluorescente DAPI.

Dado que el filamento flagelar no se encuentra ensamblado en la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$, decidimos explorar si la estructura del gancho había sido ensamblada correctamente. Para ello, teñimos con el colorante fluorescente Alexa-488, anticuerpos policlonales que reconocen a la proteína del gancho, FlgE. Dichos anticuerpos fueron incubados con las cepas de interés y la presencia del gancho en la superficie celular se observa como un solo punto o foco fluorescente. De este modo, bajo el microscopio observamos focos de fluorescencia en la cepa WS8. Por el contrario, en las células $\Delta flgP$ y $\Delta flgP/pRK-flgT$ no fue posible observar señal de fluorescencia (fig. 18 A).

Una posible explicación para entender la falta de las estructuras gancho y filamento en la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$, podría ser debido a la ausencia de las proteínas que las integran, FlgE y FliC, respectivamente. Realizamos ensayos de Western Blot, utilizando los anticuerpos α -FlgE y α -FliC, y extractos totales de la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$, y de otras cepas de referencia. Como podemos observar en la figura 18-B, tanto en la cepa silvestre WS8, como en la cepa mutante $\Delta flgP$ y en la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$ detectamos señal de la proteína del gancho, correspondiente a un peso molecular estimado a 43 kDa. Este resultado indica que la ausencia de la estructura del gancho no es consecuencia de la falta de la proteína que lo conforma.

Por otro lado, tanto en la cepa $\Delta flgP$, así como en la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$, la señal de la proteína del filamento se redujo drásticamente fig. 18B.

De acuerdo con la cascada regulatoria de la biosíntesis flagelar de *R. sphaeroides*, la falta de la estructura del gancho impide la secreción del factor anti- σ^{28} . Por esta razón, FlgM impide la transcripción de los genes de clase IV, entre ellos la flagelina (ver fig. 13). Decidimos evaluar la actividad del factor σ^{28} a través de la detección de la proteína CheY4, ya que su expresión es dependiente del factor σ^{28} (Hernández *et al.*, 2017). Conforme a lo esperado, observamos una gran reducción del nivel de la proteína CheY4 en los extractos totales de la cepa $\Delta flgP$ y la cepa $\Delta flgP/pRK-flgT$ (fig. 18B).

Los resultados anteriores nos permiten concluir que la ausencia de FlgP impide la formación del gancho, provocando un bloqueo en la biosíntesis flagelar tardía.

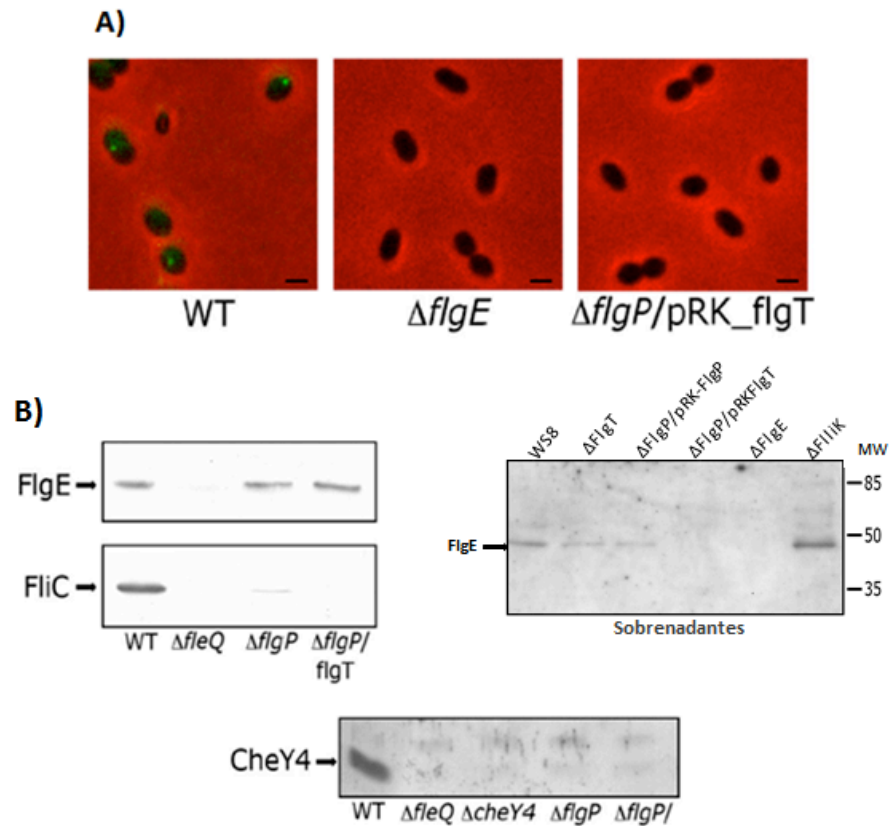


Figura 18. Panel A. Inmunofluorescencia de la proteína FlgE en la cepa $\Delta flgP/pRK_flgT$, así como en la cepa silvestre WS8 (control positivo) y en la cepa $\Delta flgE$ (control negativo). Panel B) Western blot realizado con extractos totales celulares o sobrenadantes de los cultivos celulares, revelado con anticuerpos policlonales contra las proteínas FlgE, FliC o CheY4. Las figuras son representativas de 3 repeticiones.

La detección de la proteína del gancho (FlgE) en los extractos celulares totales de la cepa $\Delta flgP/pRK_flgT$ pero no en el sobrenadante (fig. 18) indica que en ausencia de FlgP, la proteína FlgE no puede ser exportada al medio extracelular para poder ensamblarse, tal y como ocurre en la cepa silvestre WS8 y en la cepa $\Delta flgT$. Por lo tanto, en ausencia de FlgP, FlgE debe encontrarse en el citoplasma o en el periplasma celular.

El fenotipo Fla- de la cepa $\Delta flgP$, nos llevó a cuestionar si, además de la estructura del gancho y del filamento, otros componentes estructurales de la base del flagelo habían sido afectados. Por lo tanto, evaluamos la presencia del anillo MS en la cepa $\Delta flgP$.

La formación del anillo MS fue evaluada indirectamente mediante la formación de focos de fluorescencia generados por la proteína de fusión GFP-FliF. Dado que la sensibilidad de esta técnica solo permite visualizar complejos de varias proteínas y no es posible detectar fluorescencia de moléculas individuales, los focos detectados corresponden a oligómeros de la proteína GFP-FliF que previamente ha sido demostrado que co-localizan con el filamento flagelar.

Como se puede apreciar en la figura 19, la expresión de GFP-FliF tanto en el fondo genético WS8, como en la cepa $\Delta flgP$ provoca la aparición de focos de fluorescencia. Por lo tanto, este resultado sugiere que el defecto del ensamblaje del flagelo en la cepa $\Delta flgP$ no compromete la estructura del anillo MS.

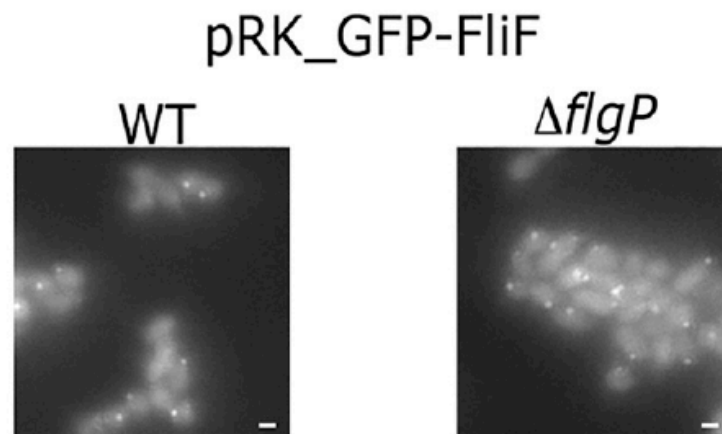


Figura 19. Detección de la proteína GFP-FliF mediante microscopía de fluorescencia. La proteína de fusión es expresada bajo control del promotor *lac* presente en pRK415. WT, corresponde a la cepa WS8.

En *S. enterica* se ha reportado que uno de los efectos de falta de alguna de las proteínas que conforman el eje (FlgB, FlgC, FlgF), o incluso de las proteínas que aportan estabilidad al eje en la pared de peptidoglicano FlgI (anillo P) y en la membrana externa FlgH (anillo L) ocasionan la degradación de la proteína del gancho (FlgE) debido a su susceptibilidad contra las proteasas periplásmicas (Bonifield *et al.*, 2000). Por lo tanto, se probó la presencia de FlgE en la cepa $\Delta flgP$ /pRK-flgT, así como en otras cepas que llevan mutaciones en los genes del eje, del aparato de exportación, y de los anillos P y L. Como se observa en la figura 20, en ausencia de la proteína FlgP, así como de los componentes del aparato de exportación, y del anillo L, la señal de FlgE se mantiene a un nivel similar al de la cepa silvestre (fig. 20 carriles 1, 3-5, 9-10 y 12).

Por el contrario, observamos que la falta de los componentes estructurales del eje, representados por las mutaciones en FlgB y FlgC, afecta negativamente la señal de la proteína del gancho, FlgE (fig. 20 carriles 6-7). En cuanto a la mutación de la proteína que conforma el anillo P, FlgI, se observó una ligera reducción de la señal de la proteína del gancho (fig. 20 carril 8).

Este resultado nos sugiere que la ausencia de FlgP no altera el ensamblaje de la estructura del eje, ya que es posible detectar la señal de la proteína FlgE a un nivel similar al observado en la cepa silvestre WS8.

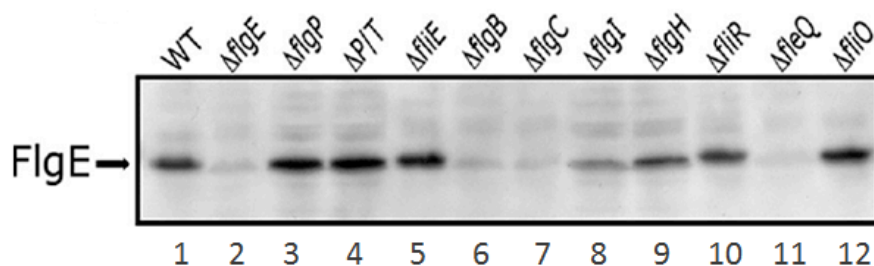


Figura 20. Inmunodetección de FlgE mediante la utilización de anticuerpos policlonales anti FlgE, en extractos celulares totales de diferentes cepas mutantes. Línea 1, extracto de la cepa silvestre WS8 (WT), línea 2 cepa que no expresa la proteína del gancho (FlgE). Línea 3, cepa mutante $\Delta flgP$. Línea 4, cepa mutante $\Delta flgP$ /pRK-flgT. Línea 5 mutante en *fliE* cuyo papel como proteína del aparato de exportación o componente del

gancho está sujeto de debate. Líneas 6 y 7 cepas con deleciones en los genes que codifican para las proteínas del eje proximal FlgB y FlgC. Línea 8 y 9 cepas con deleciones en los genes que codifican las proteínas de los anillos P y L, respectivamente. Líneas 10 y 12 mutantes en los genes que expresan proteínas del aparato de exportación, FliR y FliO. Línea 11 cepa mutante en el gen que codifica para el regulador maestro de la expresión de los genes flagelares, FleQ. La figura es representativa de 3 repeticiones.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la ausencia de la proteína FlgP afectó negativamente el ensamblaje de los componentes extracelulares gancho/filamento, mientras que los componentes intracelulares como el anillo MS y la estructura del eje se encuentran estables en la envoltura celular. Sin embargo, existe un bloqueo que impide el ensamblaje del gancho en el medio extracelular.

FlgT es otra proteína flagelar localizada en el periplasma y es responsable de la formación del anillo H que rodea a los anillos P y L, debido a su ubicación decidimos explorar si la ausencia de la proteína FlgP tiene un efecto sobre la formación o estabilidad del anillo H.

Dado que no se cuenta con una fusión fluorescente de la proteína FlgT, decidimos analizar la localización de la proteína GFP-MotF, ya que previamente había sido reportado que la localización de GFP-MotF en el flagelo es dependiente de la presencia de FlgT, por lo tanto la formación de focos de fluorescencia de GFP-MotF es indicativo de la presencia del anillo H (Fabela *et al.*, 2013). Para detectar la presencia de GFP-MotF, se utilizaron los plásmidos pINDd_FlgT, el cual expresa *flgT* a partir de un promotor fuerte; y pRK_GFP-MotF, el cual expresa la proteína de fusión a partir del promotor *lac* presente en pRK415. Ambos plásmidos fueron introducidos a las cepas $\Delta flgT$ y $\Delta flgP$. La expresión de *flgT* a partir del plásmido pIND compensa la falta de FlgT en ambas cepas, y GFP-MotF solo se localiza cuando FlgP está presente (fig. 21A).

Para asegurarnos que la falta de focos de fluorescencia no fue causada por la ausencia de FlgT o GFP-MotF, se llevó a cabo la inmunodetección de ambas proteínas

utilizando extractos totales de las cepas $\Delta flgT$ y $\Delta flgP$ con los plásmidos pINDd_FlgT y pRK_GFP-MotF. Como se observa en la figura 21B, FlgT y GFP-MotF son estables en ambas cepas.

Este resultado sugiere que la falta de FlgP tiene un efecto negativo sobre la estructura del anillo H o quizá sobre la localización de MotF; en este sentido es factible considerar que FlgP pueda ayudar a la estructuración del anillo H o bien, que ocasione algún cambio estructural en FlgT para estabilizar la interacción FlgT-MotF.

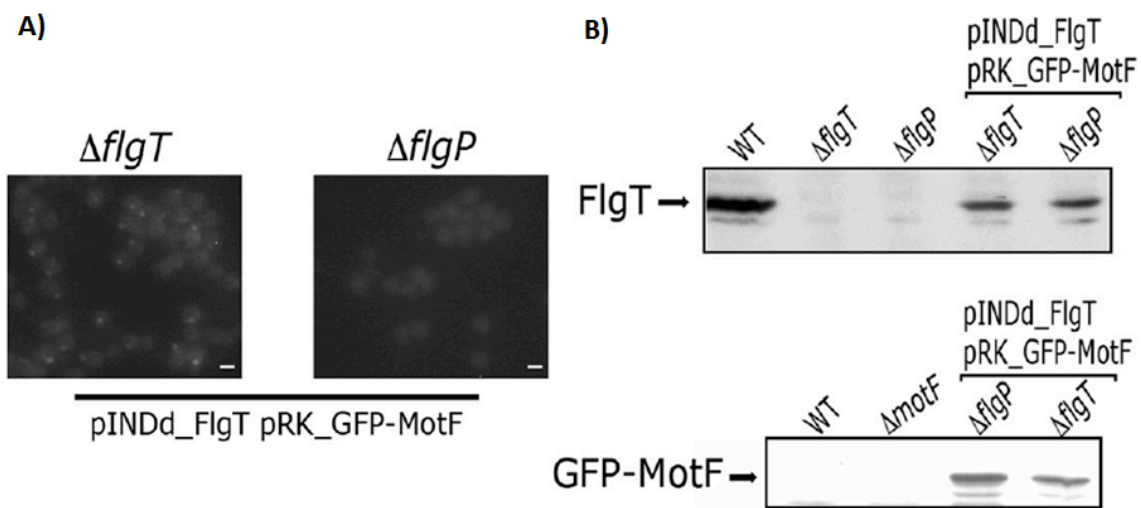


Figura 21. A) Detección de la proteína GFP-MotF mediante microscopía de fluorescencia en las cepas $\Delta flgT$ y $\Delta flgP$ conjugadas con el plásmido pIND-FlgT. B) inmunodetección de las proteínas FlgT y GFP-MotF, como control de este experimento, se incluyeron extractos de la cepa silvestre WS8 (WT), y extractos de las cepas $\Delta flgT$, $\Delta flgP$ y $\Delta motF$ como controles negativos.

Los resultados anteriores nos llevaron a considerar que FlgP podría ser un componente estructural del cuerpo basal y, por lo tanto, deberíamos ser capaces de detectar su presencia en flagelos aislados. De acuerdo con nuestra hipótesis, las muestras de flagelos aislados permitieron detectar la presencia de FlgP mediante Western blot (fig.

22B). Estas muestras también fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión, para corroborar la presencia de los flagelos (fig. 22A).

Adicionalmente, evaluamos si la proteína FlgP es estable en cepas con mutaciones en los genes que codifican para los componentes estructurales del eje, del aparato de exportación, del gancho y del anillo H. Como se observa en la figura 22C, FlgP es estable en todas las cepas probadas lo que indica que su estabilidad no depende de algún otro componente estructural, lo cual contrasta a lo observado en *C. jejuni*, en donde FlgP no pudo ser detectada en cepas mutantes en los genes que codifican para las proteínas del aparato de exportación y del eje proximal (Beeby *et al.*, 2016).

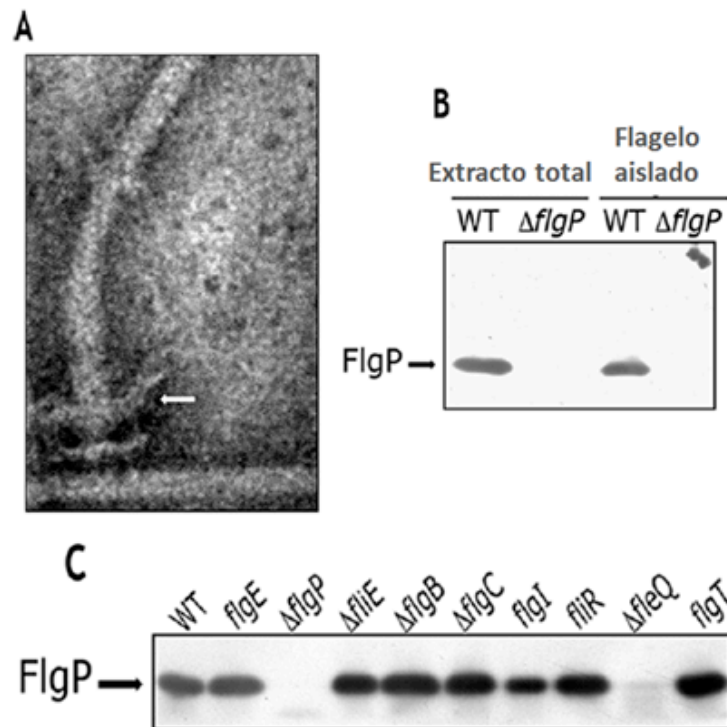


Figura 22. A) Micrografía electrónica, representativa de los cuerpos flagelares aislados de la cepa silvestre WS8. La flecha señala el anillo H. B) Western blot realizado con anticuerpos policlonales anti-FlgP, de las muestras de flagelos aislados y de los extractos totales de la cepa silvestre WS8 (WT) y de la cepa $\Delta flgP$. C) Inmunodetección de la proteína FlgP en diferentes mutantes flagelares.

Debido a que FlgP forma parte del cuerpo basal flagelar, nos propusimos evaluar su posible interacción con otras proteínas, como FlgH, FlgT, MotF y consigo misma. Para ello utilizamos el sistema de interacción de doble híbrido en levadura. Se obtuvieron los plásmidos que fusionan las regiones periplásmicas de las proteínas FlgP y FlgH, a los dominios de activación (AD) y de unión a DNA (BD) del factor transcripcional Gal4 (Gal4AD-FlgP, Gal4AD-FlgH y Gal4BD-FlgH). Las versiones que expresan a las proteínas Gal4BD-FlgT y Gal4AD-MotF fueron obtenidas previamente (Fabela *et al.*, 2013 y Suaste *et al.*, 2010). En este ensayo, la interacción positiva se basó en el crecimiento de las levaduras en diferentes diluciones, en condiciones de media (-His), y alta astringencia (-Ade-His).

Como se observa en la figura 23, fue posible observar interacciones positivas entre FlgP con FlgT y de FlgP con FlgH. De manera paralela, evaluamos la interacción entre las proteínas que conforman al anillo L (FlgH) y a la proteína que conforma el anillo H (FlgT), utilizando los plásmidos Gal4AD-FlgH y Gal4BD-FlgT. El resultado mostró una interacción robusta entre estas proteínas (fig. 23). En cuanto al ensayo de interacción entre Gal4AD-MotF y Gal4BD-FlgP, así como entre BD-FlgP y AD-FlgP, los resultados fueron no concluyentes debido a que el plásmido que expresa BD-FlgP activa inespecíficamente la expresión del gen reportero (*HIS3*).

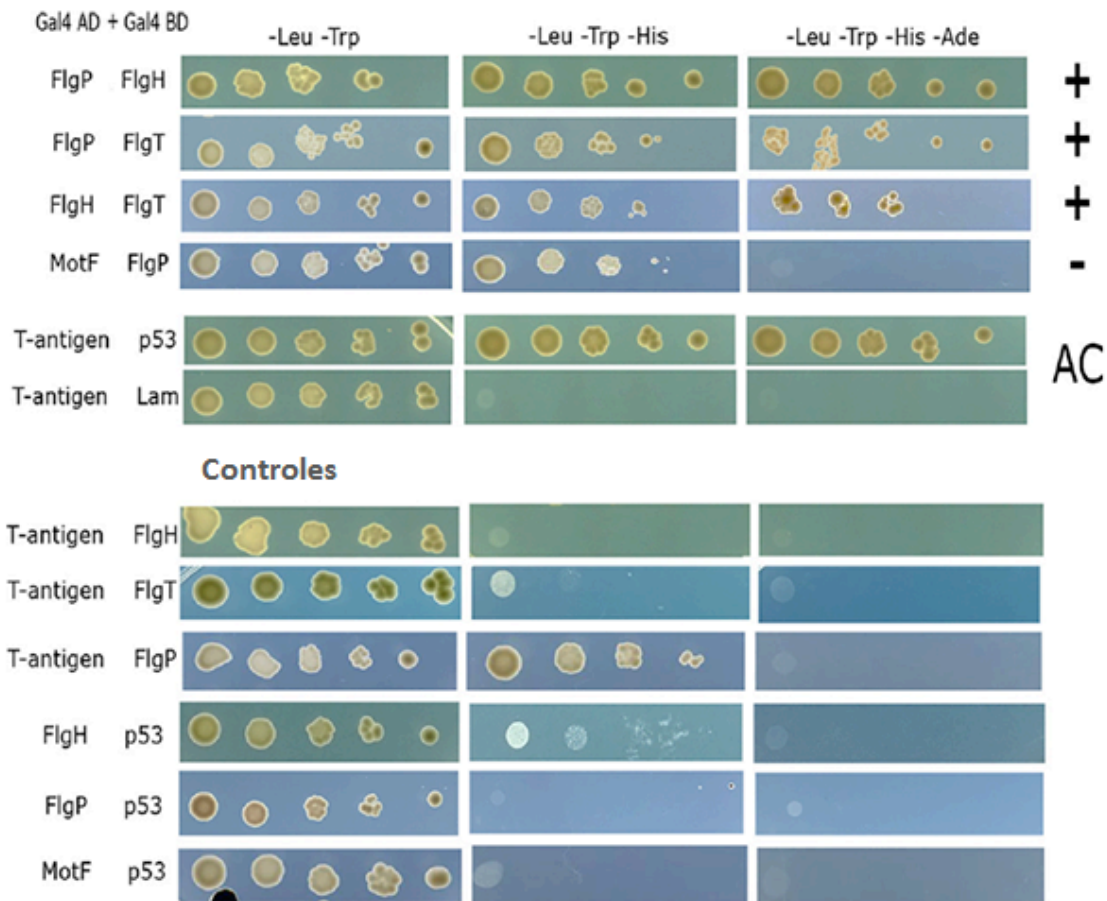


Figura 23. Evaluación *in vivo* de la interacción FlgP con FlgT, FlgH y MotF mediante ensayos de doble híbrido en *S. cerevisiae* AH109. Para evaluar la interacción de las diferentes proteínas se realizaron diluciones seriadas de las levaduras transformadas con los plásmidos AD-FlgP y BD-FlgT, BD-FlgH y por otro, las levaduras transformadas con los plásmidos AD-FlgH BD-FlgT y AD-MotF. Las diluciones de levaduras fueron crecidas en medios sintéticos (SD), carentes de leucina y triptófano (-Leu -Trp) que selecciona la presencia de los plásmidos en la célula; carente de leucina, triptófano e histidina (-Leu -Trp, -His) que además de seleccionar la presencia de los plásmidos evalúa la expresión del gen *HIS3* bajo control de GAL4; carente de leucina, triptófano, histidina y adenina (-Leu -Trp, -His-Ade) que además de seleccionar la presencia de los plásmidos y evalúa la expresión de *HIS3* y *ADE2* ambos bajo control de GAL4. Las interacciones positivas se señalan con el signo (+), y las negativas con (-). El par AD-T y BD-p53 y el par AD-T y BD-Lam corresponden a los controles positivo y negativo (AC),

respectivamente. Además, se incluyen los controles para evaluar las interacciones espurias o inespecíficas de las proteínas de interés.

Debido a que el ensayo de doble híbrido no nos brindó información al respecto de la posible interacción de FlgP consigo misma, se decidió evaluar ésta mediante electroforesis en geles nativos. Los resultados de este experimento revelaron la presencia dos patrones de migración, uno con un peso molecular aproximado a 36 kDa, que podría corresponder a una forma monomérica de la proteína FlgP, y otra banda de aproximadamente 56 kDa que podría corresponder a un arreglo dimérico (fig. 24 A). Utilizamos la misma estrategia para evaluar el comportamiento de la proteína FlgT y observamos de igual manera, la forma monomérica y dimérica, con tamaños aproximados a 54 y 113 kDa, respectivamente. También, se utilizó una mezcla de las proteínas FlgP y FlgT y observamos la aparición de un complejo de aproximadamente 90 kDa, este podría representar el complejo oligomérico formado por la asociación de las proteínas FlgP y FlgT (fig. 24A).

Para validar que las bandas observadas anteriormente están formadas por la presencia de la proteína FlgP y/o FlgT y no a elementos contaminantes durante la purificación de las proteínas, recortamos los carriles que contienen a las proteínas del gel nativo y las sometimos a electroforesis en un gel desnaturalizante SDS-PAGE. Como se observa la figura 24B, las bandas observadas en el gel nativo corresponden a los pesos moleculares de las proteínas de FlgP, FlgT o a la mezcla de ambas. Además, en la muestra que incluyó ambas proteínas, se observó que en la posición correspondiente a la migración del complejo de 90 kDa, se encuentran ambas proteínas; mientras que en la muestra que solo contiene FlgT en esa posición hay muy poca cantidad de FlgT (flecha negra en fig. 24).

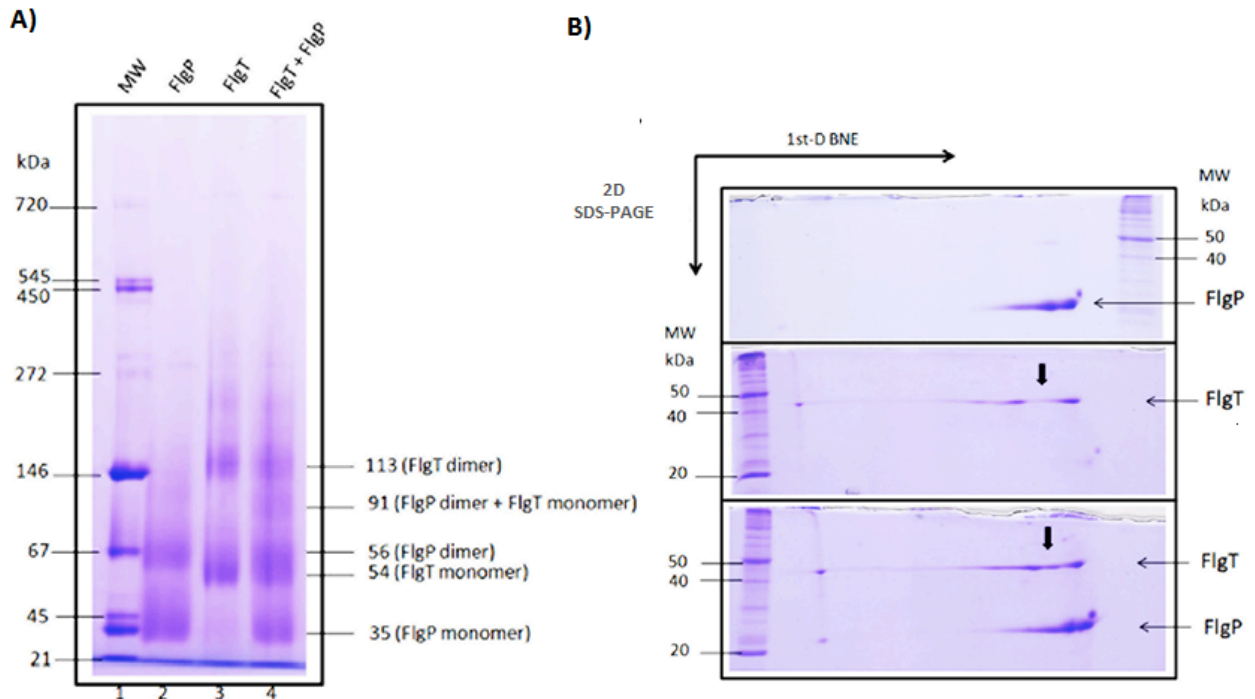


Figura 24. Electroforesis en geles nativos de los complejos multiméricos formados por las proteínas FlgP, FlgT y FlgP-FlgT. A) 100 μ g de las proteínas indicadas en la parte superior del gel fueron sujetas a electroforesis en un gel de 4 a 15% de acrilamida. MW, corresponde a los marcadores de peso molecular. B) Los carriles obtenidos del gel nativo fueron analizados mediante electroforesis desnaturizante (segunda dimensión, 2D) utilizando un gel de acrilamida al 14%. MW, corresponde a los marcadores de peso molecular.

Las interacciones de la proteína FlgP con FlgT, MotF y FlgH fueron evaluadas también mediante ensayos de co-precipitación (pull-down). Para ello, utilizamos la versión recombinante de la proteína GST-FlgP o GST como proteínas cebo inmovilizadas en perlas de agarosa. Para cada muestra agregamos 1 μ g de la proteína His-FlgT, His-MotF, o His-FlgH como proteína presa. Después de incubar durante 1h, recuperamos mediante centrifugación las proteínas GST-FlgP y GST, y tras varios lavados, las proteínas fueron eluidas para realizar ensayos de Western blot con anticuerpos policlonales contra el epítipo His6X presente en las proteínas presa.

Como se observa en la figura 25, fue posible detectar señal de la proteína His-FlgT, lo que valida la interacción específica observada entre FlgP y FlgT. En cuanto a la interacción entre GST-FlgP y His-MotF, no es posible considerar la existencia de una interacción positiva, ya que His-MotF fue detectada tanto en la muestra que contiene GST-FlgP así como en la que solo contiene GST (control de interacción inespecífico). Una situación similar fue observada para la interacción entre GST-FlgP y His-FlgH (fig. 25).

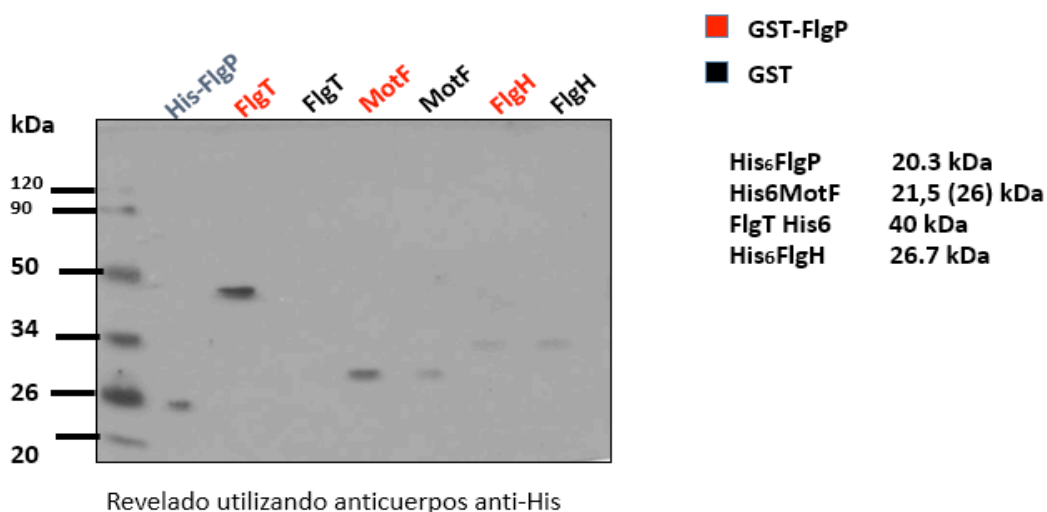


Figura 25. Ensayo de coprecipitación (pull-down). Las proteínas His-FlgT, His-MotF y His-FlgH fueron incubadas con la proteína recombinante de GST-FlgP (líneas marcadas con letra roja), o con GST (líneas marcadas con letra negra). Posterior a la coprecipitación, las muestras fueron analizadas mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-His6X. La imagen es representativa de tres experimentos.

Otra estrategia experimental que fue utilizada para evaluar la interacción entre FlgP y FlgH fue mediante un ensayo de Far-Western. Para ello, se sometieron a las proteínas FlgP, FlgH y GFP a electroforesis en un gel desnaturizante (SDS-PAGE) y posteriormente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue

incubada con GST-FlgP durante 2 h y después de lavar se reveló utilizando anticuerpos en contra de la proteína FlgP. Como se observa en la figura 26, fue posible detectar la presencia de la proteína FlgP en el carril que contiene a la proteína FlgH, pero no en el carril cargado con la proteína His-GFP, que en este caso fue utilizada como control negativo. El resultado de este ensayo apoya la existencia de la interacción entre FlgP y FlgH, previamente observada en los ensayos de doble híbrido.

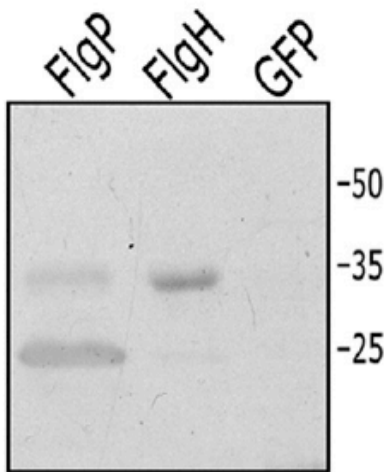


Figura 26. Interacción entre FlgP y FlgH, evaluada mediante Far-western. Las proteínas indicadas fueron sujetas a SDS-PAGE y posteriormente transferidas a una membrada de nitrocelulosa. Posterior a ser incubada con GST-FlgP, esta fue revelada con los anticuerpos policlonales contra FlgP.

Discusión

El flagelo bacteriano es considerado un dogma de la biología molecular, por lo que su estudio aporta evidencia para entender cómo las bacterias han ido adaptando la estructura flagelar a su estilo de vida.

Se han caracterizado componentes adicionales a la estructura flagelar central o núcleo, como por ejemplo los anillos H y T descritos en *Vibrio* spp (Terashima *et al.*, 2006). Recientemente el uso de la criotomografía electrónica ha permitido observar *in situ* nuevas estructuras en el motor flagelar de múltiples especies de bacterias (Chen *et al.*, 2011). En varias ocasiones, estas estructuras están asociadas a los motores flagelares que alcanzan velocidades superiores de las que han sido descritas para *E. coli* (Chaban y Beeby, 2018), en otros casos, su función podría estar relacionada con la remodelación de la envoltura celular; o para ofrecer flexibilidad al motor flagelar durante la rotación (Zhu *et al.*, 2017). Particularmente, en *C. jejuni* se describieron varios discos: disco basal, disco medio y disco proximal, involucrados posiblemente en la estabilidad y el reclutamiento de los estatores. Uno de estos discos, denominado disco basal, está formado por la lipoproteína FlgP la cual también forma una estructura similar al disco basal en el motor de *V. fischeri* (Beeby *et al.*, 2016). Hasta el momento, no se ha caracterizado en detalle el papel que cumple FlgP en la formación y/o funcionamiento del flagelo.

La proteína FlgP de *R. sphaeroides* es similar a la proteína FlgP de *V. cholerae* y *C. jejuni*, con porcentajes de identidad estimados en 25 y 27%, respectivamente.

En *C. jejuni* se caracterizó por primera vez el fenotipo asociado a la falta de esta proteína. Se describió que la ausencia de FlgP produce células no motiles pero con flagelos aparentemente normales (Sommerlad y Hendrixson, 2007). En *V. cholerae* se observó que la falta de FlgP afecta negativamente la capacidad de nado de la bacteria, debido a la incapacidad para rotar el flagelo (Morris *et al.*, 2008). Como dato adicional, se demostró que en ausencia de FlgP más del 50% de la población de células presentaron problemas en la estabilidad del filamento, ocasionando su desprendimiento o rompimiento (Martinez *et al.*, 2009).

En *R. sphaeroides* el fenotipo asociado a la falta de FlgP fue distinto a los ejemplos antes mencionados, ya que en este caso la falta de FlgP hace imposible la síntesis de flagelo; esta diferencia podría ser debida a que en *R. sphaeroides* el papel de FlgP no es redundante, y que en otras especies bacterianas la presencia de discos o anillos adicionales podría favorecer la biogénesis flagelar en ausencia de FlgP.

En este trabajo determinamos que la cepa $\Delta flgP$ es incapaz de ensamblar las estructuras del gancho y del filamento. Este resultado es similar a lo que Beeby y colaboradores (2016) observaron en las imágenes de criotomografía obtenidas de los cuerpos basales de *V. fischeri*. En ese caso, las imágenes revelaron que la falta de la proteína FlgP altera la capacidad para ensamblar las estructuras, gancho-filamento. A pesar de que los autores no exploran a detalle este resultado, proponen a la proteína FlgP como un componente estructural denominado disco basal, el cual está relacionado con la estabilidad del sistema estator (Beeby *et al.*, 2016).

En *R. sphaeroides* demostramos que en la mutante $\Delta flgP$, la ausencia de la estructura del gancho no es consecuencia de falta de la proteína que lo conforma, debido a que la proteína FlgE permanece estable en la cepa mutante. Demostramos además, que la proteína FlgE no es exportada al medio extracelular, por lo que suponemos que la proteína FlgE se encuentra resguardada en el citoplasma y en el lumen de la estructura del eje.

En *S. enterica*, se sabe que la transición de eje a gancho requiere que el anillo L (FlgH), forme un poro en la membrana externa y a su vez, desplace al medio extracelular a la proteína FlgJ y posteriormente el factor anti- σ^{28} sea secretado (Cohen y Hughes, 2014).

En *R. sphaeroides* proponemos que FlgP podría estabilizar la formación del poro de la membrana externa a través de la interacción con el anillo L. En ausencia de FlgP, no es posible liberar al medio extracelular a la proteína del gancho, FlgE y de igual manera al factor anti- σ^{28} . Resaltando la importancia de este mecanismo como punto de control para iniciar la expresión de los genes dependientes del factor σ^{28} , entre ellos la flagelina (Poggio *et al.*, 2005). Como vimos en nuestros resultados, esta idea es posible, ya que al evaluar la presencia de la proteína FliC, en la cepa $\Delta flgP$, no fue posible detectar señal de la proteína, tanto al interior de la bacteria, como en el medio

extracelular. Además en esta cepa tampoco se detectó la presencia de CheY4 cuya expresión es dependiente de σ^{28} .

En muestras de flagelos purificados de la cepa silvestre WS8 fue posible detectar la presencia de FlgP, indicando que esta proteína es un componente estructural. En base a las observaciones realizadas por criotomografía en *V. fisheri*, es posible suponer que FlgP se encuentra en la parte superior o externa del anillo H (Beeby *et al.*, 2016). Lo anterior podría corroborarse mediante observaciones en el microscopio electrónico de muestras de flagelos sujetos a inmunomarcaje de FlgP con partículas de oro.

En *V. fisheri*, se propone un modelo en donde el anillo H conformado por la proteína FlgT, es ensamblado previamente al disco basal (conformado por FlgP) y que ambas estructuras se encuentran unidas (Beeby *et al.*, 2016). Por otro lado, en *C. jejuni*, FlgP forma el disco basal, con ayuda de la proteína FlgQ, y debido a su cercanía física con el anillo P, se propone que el disco basal está interactuando con el anillo P. De hecho, se describió que la estabilidad de la proteína FlgP depende de la presencia de otros componentes flagelares como la proteína FlgQ, el eje, o el aparato de exportación (Beeby *et al.*, 2016).

En el genoma de *R. sphaeroides* no hay genes similares a *flgQ* o *flgO* y a diferencia de lo que ocurre en *C. jejuni*, FlgP se mantiene estable en ausencia de componentes estructurales del eje, del aparato de exportación, o incluso del anillo H; este resultado podría sugerir que la estabilidad de FlgP de *R. sphaeroides* es independiente de cualquier otro componente estructural.

En este trabajo demostramos que FlgP interactúa no solo con la proteína del anillo L (FlgH), sino también con la proteína del anillo H (FlgT). Además, nuestros resultados indican que FlgT y FlgH son capaces de interactuar entre ellas. El hecho de que la cepa $\Delta flgT$ sea capaz de ensamblar el flagelo sugiere que la proteína FlgP se encuentra asociada en el flagelo aún en ausencia de FlgT, lo anterior podría ocurrir gracias a las interacciones de FlgP con FlgH.

Nuestros resultados podrían ser resumidos en el modelo de la figura 26 en donde la estructura formada por FlgP (disco basal), se une al anillo L para estabilizar o remodelar la estructura y permitir la apertura de la membrana externa y la secreción de

FlgJ. Además, FlgP podría favorecer el reclutamiento de la proteína FlgT o la remodelación del anillo H.

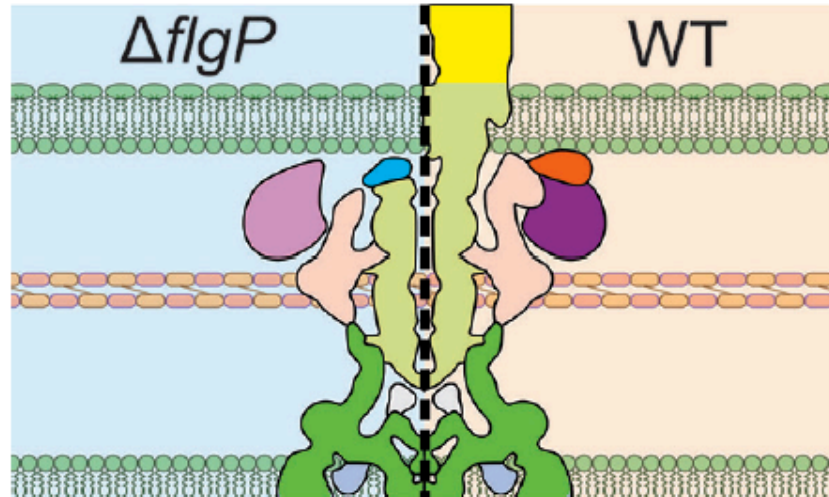


Figura 26. Modelo que ilustra el posible papel de FlgP durante la biosíntesis flagelar de *R. sphaeroides*. En la cepa silvestre WS8 (derecha, WT). FlgP (anaranjado), interactúa con FlgH (rosa) y FlgT (violeta). La estructura del gancho (amarillo) está formada. En ausencia de FlgP (izquierda). El gancho no se ensambla, posiblemente porque FlgJ (azul) se encuentra en la punta del eje, la membrana se encuentra cerrada. Adicionalmente, FlgT (violeta de menor intensidad) se encuentra ausente o deslocalizado.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados durante este trabajo se enlistan en la tabla 1. Los medios de cultivo para el crecimiento de las cepas de *E. coli* se realizaron en medio LB y las cepas fueron incubadas a 37°C con agitación de 200 rpm. *Rhodobacter sphaeroides* fue cultivada en medio mínimo SIS (Sistrom, 1962) a 30°C con agitación constante de 200 rpm. La concentración de antibióticos utilizados en los medios de cultivo de *E. coli* y *R. sphaeroides* se enlista en la tabla 2.

Medio Luria Bertani, 1951 (LB)

Se preparó utilizando 1% de bacto triptona, 1% de cloruro de sodio y 0.5% de extracto de levadura, disueltos en agua bidestilada y esterilizados en autoclave. Para la elaboración de medio sólido, se agregó 1.5% de bacto agar.

Medio mínimo Sistrom (SIS)

Se preparó de acuerdo a Sistrom, 1962. Utilizando 15 mM de ácido succínico, 0.67 mM de ácido glutámico, 0.25 mM ácido aspártico, 8.5 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fosfato dibásico de potasio, 3.78 mM de sulfato de amonio, 1.04 mM ácido nitriloacético, 1.2 mM de sulfato de magnesio, 0.23 mM de cloruro de calcio, 7 µM de sulfato ferroso, 0.16 mM de molibdato de amonio y 0.1 ml/l de elementos traza, siendo el pH ajustado a 7 con hidróxido de potasio. Una vez esterilizado y a temperatura ambiente, se adicionaron 0.1 ml/l de vitaminas.

Solución de elementos traza

4.7 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 38 mM de sulfato de zinc, 18 mM de sulfato ferroso, 9 mM de sulfato de magnesio, 1.5 mM de sulfato cúprico y 1.8 mM de ácido bórico, disueltos en agua bidestilada.

Vitaminas

Solución de 1 % ácido nicotínico, 0.5% de tiamina y 0.01% de biotina, diluidos en agua bidestilada.

Medio YPDA para levadura.

La cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó a 30°C en agitación constante de 200 rpm, el medio que utilizado fue YPDA, el cual contiene 2 % de peptona, 1% extracto de levadura 1.5 % (15ml/L) de adenina al 0.2%. Para preparar cajas de medio sólido, se agregó Bactoagar al 1.5%.

Tabla 1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Cepa plásmido	Característica relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
LMG194	$\Delta lacX74 galE thi rpsL \Delta phoA \Delta ara714 leu::Tn10$	Invitrogen
S17-1	$recA endA thi hsdR RP42 Tc::Mu::Tn7$	Simon et al., 1983
TOP 10	cepa de clonación	Invitrogen
Rosetta	cepa para sobre expresar proteínas; Cm ^r	Invitrogen
HB101	Cepa de clonación	Boyer y Roulland, 1969
levadura		
AH109	levadura reportera para HIS3, ADE2 y LacZ	Clontech
<i>R.sphaeroides</i>		
WS8	cepa silvestre	Sockett et al., 1990
CP1	$\Delta flgP::aadA$	Este estudio
CP2	$\Delta flgH::aadA$	Este estudio
LC1	$flgE::aadA$	Ballado et al., 2001
Rsgl-np	$flgI::aadA$	Gonzalez et al., 2002
SF3	$flgT::aadA$	Fabela et al., 2013
SP2	$fliR::uidA-aadA$	Poggio et al., 2000
SP13	$\Delta fleQ::aadA$	Poggio, 2005
SP30	$\Delta fliE::aadA$	Colección del laboratorio
SP31	$\Delta flgC::aadA$	Colección del laboratorio
SP32	$\Delta flgB::aadA$	Colección del laboratorio
SP33	$\Delta fliO::aadA$	Colección del laboratorio
Plásmido		
pBAD-FlgP	vector de expresión His6X-FlgP	Este estudio
pBAD/HisB	vector de expresión con la secuencia de His6 _x	Invitrogen
pBAD/Myc-HisA-FlgT	vector de expresión FlgT-His6 _x	Fabela et al., 2013
pBAD HisMotF	vector de expresión His6 _x -MotF	Ramírez et al., 2012
pET28a	vector de expresión His6 _x	Invitrogen
pET28-FlgH	vector de expresión His6 _x -FlgH	Este estudio
pGAD-FlgP	derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-FlgP	Este estudio

pGAD-FlgH	derivado de pGAD que expresa GAL4 ADFlgH	Este estudio
pGAD- motF	derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-MotF	Ramirez et al., 2012
pGADT7	plásmido con dominio de activación GAL4, LEU2	Clontech
pGBD-FlgP	derivado de pGAD que expresa GAL4 BD-FlgP	Este estudio
pGBD-FlgH	derivado de pGAD que expresa GAL4 BD-FlgH	Este estudio
pGBD-FlgT	derivado de pGAD que expresa GAL4 BD-FlgT	Fabela et al., 2013
pGBKT7	plásmido con dominio de unión GAL4, TRP1	Clontech
pGEX-4T-2	vector de expresión para fusión de proteínas	Amersham
pGEX-4T-2-FlgP	GST	Este estudio
	plásmido de expresión de la fusión FlgP-GST	
	vector de expresión inducible por IPTG para <i>R. sphaeroides</i>	
pIND4	<i>sphaeroides</i>	Ind et al., 2009
pINDd	pIND4 $\Delta lacI$	Este estudio
pIND4 -FlgT	pIND que expresa a FlgT	Fabela et al., 2013
pJQ-FlgP::aadA	pJQ que lleva <i>flgP::aadA</i>	Este estudio
pJQ-FlgH::aadA	pJQ que lleva <i>flgH::aadA</i>	Este estudio
pJQ200mp18	vector suicida móvil Gm ^r en <i>R. sphaeroides</i>	Quandt y Hynes, 1993
pRk415	vector de expresión utilizado en <i>R. sphaeroides</i>	Keen et al., 1988
pRK_flgP	pRK que expresa a <i>flgP</i>	este estudio
pRK_flgPT	pRK que expresa a <i>flgPT</i>	este estudio
pRK_flgH	pRK que expresa a <i>flgH</i>	este estudio
pRK_flgT	pRK que expresa a <i>flgT</i>	Fabela et al., 2013
pRK_GFP-FliF	pRK que expresa la fusión GFP-FliF	colección del laboratorio
pRK_GFP-MotF	pRK que expresa la fusión GFP-MotF	Ramirez et al., 2012
pTZ19R	vector de clonación Ap ^r	Thermo Fisher Scientific
pTZ19R-BamHI-	pTZ19R sin el sitio BamHI	Colección del laboratorio
pTZ19R-flgP::aadA	pTZ que lleva <i>flgP::aadA</i>	Este estudio
pTZ19R-flgPUp-Down	pTZ que lleva <i>flgPup-down</i>	Este estudio
pTZ19R-BamHI-flgH::aadA	pTZ que lleva <i>flgH::aadA</i>	Este estudio
pTZ19R-BamHI-flgHup-dowd	pTZ que lleva <i>flgHup-down</i>	Este estudio

Oligonucleótido	Secuencia
orf_11	5' GCTCTAGACCTTGCCCGCCGCATCGTGG 3'
RvRSP0035B	5' GCAGATCTGCCCGGCTGGCCCGCGACGG 3'
FwRSP0035B	5' GCAGATCTTATCGTCAAGGCGGCACGGCTG 3'
orf_12	5' GCTCTAGACGTTTCAGCGCCTCCACATGG 3'
Fw_flgH	5' GCTCTAGAGGTGCTGATGCCCGACGG 3'
Rvi_flgH	5' GCGGATCCACGATGTCCGCCACCCGC 3'
Fwi_flgH	5' GCGGATCCGCTCGACGACGGGGTGCT 3'
Rv_flgH	5' CGGAATTCGCGCACGCGGATCGAGGT 3'
0035fwBAD	5' GCAGATCTGCGCCGGGGCCGCGCGCGGTC 3'
0035RvBAD	5' GCGAATTCGAAGCCGTTTCACCGCAGCCG 3'
flgH-pGABfw	5' GCGAATTCTCGACCTATGTGAGGACCGC 3'
flgH-pGABrv	5' GCGGATCCGAAGCGCTGCGAGAAGGAGAG 3'
0035fwpGA-pGB	5' GCCCATGGCGCCGGGGCCGCGCGCGGTC 3'
0035rvBAD	5' GCGAATTCGAAGCCGTTTCACCGCAGCCG 3'
flgH-pBADB	5' GCAAGCTTGAAGCGCTGCGAGAAGGAGAG 3'
0035FwpGEX	5' GCGAATTCGCCGCGCCGGGGCCGCGCGCGGTC 3'
0035RvpGEX	5' GCGTCGACGAAGCCGTTTCACCGCAGCCG 3'

Tabla 2. Concentraciones de antibioticos utilizados

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Espectinomicina (µg/ml)	50	50
Kanamicina (µg/ml)	50	25
Tetraciclina(µg/ml)	10	1
Gentamicina(µg/ml)	30	5
Ampicilina (µg/ml)	100	-

Técnicas de manipulación de DNA

Para el aislamiento de plásmidos fueron utilizados métodos convencionales previamente descritos en Ausubel *et al.*, 1987. De acuerdo a protocolos estandarizados en el laboratorio, se realizaron digestiones de DNA con enzimas de restricción, adquiridas de New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA), Roche (Basel, Switzerland) o Invitrogen (Carlsband, CA). Las amplificaciones de los fragmentos de DNA utilizados en este trabajo, se obtuvieron utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1 y la enzima DNA polimerasa PrimeSTAR HS (Takara, Mountain View, CA).

Los productos de las reacciones de digestión enzimática así como de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis en amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8). Para la purificación de los fragmentos de DNA fue utilizado el Kit comercial de purificación QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen)

Purificación de plásmidos en pequeña escala (mini preparaciones hervidas)

Para el aislamiento de los plásmidos de las cepas de *E. coli*, se creció la cepa de interés

Hasta una fase de crecimiento estacionaria, se centrifugo 1.5 ml del cultivo a 15000 x g durante 1 min, se descartó el sobrenadante y se homogeneizó el paquete celular en el medio remanente. Posteriormente, se lisaron las células agregando 300 µl de solución STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50mM EDTA pH8, 50mM Tris-Hcl pH8) y 20 µl de lisozima (10 µl/ml), se mezcló vigorosamente (vórtex) por 3 s, e inmediatamente se colocó el tubo en agua hirviendo durante 45 s. A continuación, se separaron los restos celulares del sobrenadante, centrifugando la preparación a 15000 x g durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado en un tubo de micro centrifuga limpio, y se agregaron 300 µl de isopropanol. Para favorecer la precipitación del material genético se mezcló por inversión la muestra, hasta homogenizar la fase acuosa y el alcohol. Se dejó incubar en hielo durante 10 min. Para precipitar el DNA plasmídico se centrifugó a 15000 x g durante 20 min a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, y la muestra precipitada en el fondo del tubo fue lavada mediante la adición de 400 µl de 70% etanol (4°C) mezclando por inversión el contenido del tubo varias veces. Se descartó el sobrenadante y el precipitado restante se dejó secar en una placa térmica a 70°C durante 10 min. Finalmente, se resuspendió el DNA plasmídico en 35 µl de agua bidestilada.

Transformación Bacteriana.

Para introducir los diferentes plásmidos en las cepas de *E. coli*, se realizó el siguiente procedimiento. Primero se homogeneizó suavemente 1 µl del producto de la reacción de ligación, o del plásmido de interés en 40 µl de células de *E. coli*, preparadas electrocompetentes. Posteriormente, se dio un pulso eléctrico a la muestra celular en una celda de electroporación a 1.75 Kv. Inmediatamente, se recuperó el contenido en 1 ml de medio LB y se incubó el cultivo a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante 50 min. Posterior al tiempo de incubación, se procedió a sembrar 100 µl del producto de transformación en agar sólido LB con la concentración de antibiótico correspondiente (tabla 2) y se dejó incubar a 37°C durante 12 h.

Aislamiento de cepas mutantes

Para aislar la cepa $\Delta flgP$ ($flgP::aadA$). Se utilizaron los oligonucleótidos ORF_11, ORF_12 para amplificar por PCR las regiones río arriba y río abajo de $flgP$, denominadas $FlgP-Up$ y $FlgP-down$, de 756 y 1293 pb respectivamente. Los productos de PCR fueron ligados a través del sitio de restricción BglII. El producto de ligación (2049 pb) fue amplificado en una reacción de PCR y clonado en el plásmido pTZR19-BamHI-. Por otro lado, amplificamos el gen $aadA$, como una región interna del cassette omega Spc^r (que libera la señal de terminación transcripcional). Posteriormente, clonamos el producto de PCR del gen $aadA$ mediante el sitio BglII que está presente en el plásmido que lleva la construcción $FlgP-up$ y $FlgP-down$. El fragmento resultante denominado $flgP::aadA$ se clonó en el plásmido suicida pJQ200mp18, y finalmente, el nuevo plásmido obtenido se introdujo en la cepa WS8 mediante conjugación triparental. Los eventos de doble recombinación en la cepa WS8 nos permitieron seleccionar la versión mutante de WS8 con la sustitución del alelo $flgP$ silvestre por la versión del alelo interrumpido $flgP::aadA$, la cual nombramos *R sphaeroides* CP1 ($\Delta flgP$).

Para aislar la cepa $\Delta flgH$ ($flgH::aadA$) se utilizaron los oligonucleótidos FW/FlgH-RVI/FlgH y FWI/FlgH-RV/FlgH para amplificar las regiones río arriba y río debajo de la secuencia nucleotídica de $flgH$ ($flgH-up$ y $flgH-down$) de 701 y 1009 pb respectivamente. Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron purificados por los métodos citados en este trabajo. Posteriormente, ambos fragmentos fueron clonados en los plásmidos pCRBlunt II-TOPO Invitrogen. Se obtuvieron así los plásmidos pTOPO-FlgH_up y pTOPO-FlgH_down. A partir de estos plásmidos se purificaron los fragmentos FlgH-Up y FlgH-Down, mediante digestiones enzimáticas, utilizando las enzimas XbaI-BamHI para el fragmento flgH-Up y EcoRI-BamHI para el fragmento flgH-Down. A partir de los fragmentos puros, se preparó una reacción de ligación para unir ambos fragmentos mediante el sitio BamHI. El nuevo producto obtenido FlgHUP+Down, fue clonado en el plásmido pTZ19R/BamHI-. A partir de esta construcción, se linearizó el plásmido mediante una reacción enzimática con BamHI, y se clonó el producto de PCR del gen $aadA$ previamente digerido con la enzima de restricción BglII. El plásmido

resultante denominado pTZ-flgH::aadA se utilizó para purificar el fragmento *flgH::aadA*, el cual fue subclonado en el vector suicida pJQ200mp18, previamente digerido con la enzima de restricción SmaI. La nueva construcción denominada pJQ-flgH::aadA se introdujo mediante transformación en la cepa de *E. coli* TOP10. La cepa resultante se conjugó con WS8 de acuerdo a los métodos citados anteriormente. Los eventos de doble recombinación en la cepa WS8 permitieron seleccionar la versión mutante de WS8 con la sustitución del alelo *flgH* por la versión del alelo interrumpido *flgH::aadA*, la cual nombramos *R. sphaeroides* CP2 (Δ *flgH*).

Conjugación bacteriana triparental

Se utilizaron 1.5 ml de cultivo crecido a una $OD_{600\text{ nm}} = 0.4$ de las cepas *E. coli* Top10 (cepa donadora), *R. sphaeroides* (cepa receptora) y *E. coli* HB101 (cepa denominada Helper, que posee los genes necesarios para la transferencia de plásmidos con oriT. Boyer y Roulland, 1969). Los tres tubos se centrifugaron a 15000 x g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, asegurando de eliminar la mayor cantidad de medio remanente. Posteriormente, se resuspendieron las células en 1 ml de medio LB y se homogeneizó la preparación. En seguida, se centrifugaron nuevamente los tubos durante 1 min a 15000 x g, se descartó nuevamente el medio de cultivo y se repitió el procedimiento una vez más. Finalmente, se mezclaron las tres diferentes cepas. Primeramente se resuspendió uno de los tubos con 1 ml de medio LB y con el mismo medio, se resuspendieron los paquetes celulares restantes. La mezcla resultante se centrifugó por 1 min a 15000 x g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en el medio remanente (20 μ l aprox.). Se colocó cuidadosamente sobre un rectángulo de nitrocelulosa estéril (0.5 x 0.5 cm aprox), previamente colocado en una caja Petri con agar LB. Después de unos cuantos minutos, se verificó que el líquido hubiera sido absorbido por el agar, y entonces la caja se llevó a incubar a 30°C, durante 5 h. Pasado este tiempo, se transfirió la membrana en un tubo Eppendorf que contenía 0.5 ml de LB sin antibiótico, y se homogenizó mecánicamente con ayuda de un vórtex. De esta suspensión, se sembraron 40 μ l en cajas de agar con medio LB adicionado con el antibiótico correspondiente, y se incubaron a 30°C.

Ensayo de nado en cajas de agar suave

Para evaluar la capacidad de nado de las cepas de *R. sphaeroides*, se inocularon 3 ml de medio de cultivo SIS con las cepas de *R. sphaeroides* de interés, se incubaron hasta una $DO_{600nm}=0.7$ u.a. de este medio se tomo una alicuota de 3 μ l y se colocó sobre una caja de Petri conteniendo medio SIS (Sistrom, 1962) adicionado con 0.2% agar.

La capacidad de nado se evaluó después de 48 h de incubación en una cámara húmeda a 30°C. Del mismo modo, se observó la capacidad de nado de las cepas de *R. sphaeroides*, bajo el microscopio en campo oscuro.

Tinción del flagelo de *R. sphaeroides*

A partir de un cultivo de *R. sphaeroides* crecido a una $DO_{600nm} = 0.6$ u.a. se fijaron 250 μ l de cultivo celular, agregando 25 μ l de 30% paraformaldehído. La preparación se mezcló suavemente y se mantuvo estático a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se agregaron 75 μ l del compuesto fluorescente DAPI (50 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se colocó una alicuota de 3 μ l de la preparación celular sobre una superficie de 0.75% agarosa (diluida en medio SIS), previamente colocada en un portaobjetos.

Las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 600, acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-Er. Exponiendo la preparación a una longitud del espectro de luz de 405 nm, durante 0.8 s.

Inmuno-fluorescencia de la estructura del gancho.

A partir de un cultivo de las cepas de interés de *R. sphaeroides*, crecidas a una $DO_{600nm}= 0.6$ u.a. se fijaron 500 μ l de cultivo celular agregando 50 μ l de 30% paraformaldehído. Se mezclaron suavemente y se dejaron inmóviles durante 20 min a temperatura ambiente. Se utilizaron 100 μ l de la preparación celular y se añadieron 300 μ l de solución de fosfatos PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM

KH₂PO₄, pH 7.4) y se centrifugaron a 15000 x g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y añadieron nuevamente 300 µl de buffer PBS. El contenido celular fue resuspendido y nuevamente se precipitó mediante centrifugación a 15000 x g. Se retiró el medio remanente de PBS y se resuspendió suavemente el paquete celular en 50 µl de PBS adicionado con 1% BSA (albúmina de suero bovino, 1mg/ml). La muestra fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min.

Por otro lado, se marcaron anticuerpos policlonales contra la proteína FlgE. Utilizando el kit comercial Zenon mouse labeling Alexa 488 (Invitrogen, Carlsband, CA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se incubaron 1 µl de anticuerpo α-FlgE con 5 µl del reactivo "A" del kit Alexa 488 durante 5 min; evitando exponer la preparación a la luz del ambiente. Posteriormente, se incorporaron 5 µl del reactivo "B" Alexa 488 y se dejaron incubar por 5 min más. Finalmente, se incubaron 50 µl de las células previamente suspendidas en PBS/1% BSA, con 5 µl de la mezcla de anticuerpos marcados fluorescentemente. La solución resultante se incubó estáticamente, durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se colocó una alícuota de 3 µl de cultivo sobre una superficie de 0.75% agarosa (diluida en medio SIS), previamente colocada en un portaobjetos. Las imágenes de fluorescencia se tomaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 600 acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-Er. La preparación se expuso a una longitud de onda de 488 nm durante 3 s.

Detección de la proteína FlgE en el sobrenadante y fracción celular.

A partir de un cultivo de *R. sphaeroides* crecido a una densidad óptica de DO_{600nm} = 0.8 u.a., se colocaron 1.5 ml de cultivo en un tubo de micro centrifuga para agitarlo vigorosamente (mediante vortex) durante 12 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 5 min a 15500 x g en una centrifuga refrigerada a 4°C (Eppendorf 5415 R). El sobrenadante se recuperó en otro tubo para un segundo proceso de centrifugación en las mismas condiciones. Para provocar la precipitación de las proteínas en el sobrenadante, se agregó TCA (ácido tricloroacético 100%) a una concentración final de 25%. Luego de incubar la muestra en hielo durante 15 min, se centrifugo la muestra una vez más durante 5 min a 15500 x g a 4°C (Eppendorf 5415 R).

Descartamos el sobrenadante y el paquete de proteínas precipitado lo resuspendimos en 20 μ l de amortiguador de carga Laemmli, 1970. Posteriormente, tanto la muestra de proteínas precipitadas, como los extractos celulares de las cepas de *R. sphaeroides*, fueron analizados mediante Western blot.

Inmunodetección tipo Western Blot.

Las muestras de proteínas utilizadas para inmunodetección fueron obtenidas de extractos celulares totales, provenientes de 1.5 ml de cultivo celular de *R. sphaeroides*. Para ello, se crecieron cultivos de las cepas de interés a una $DO_{600nm} = 0.7$ u. a. en este punto, se recuperó el paquete celular por centrifugación a 15000 x g durante 2 min. Posteriormente, el paquete celular fue resuspendido en 100 μ l de una solución de lisis, 2% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 50 mM Tris pH 7.5. El contenido proteico se separó mediante 12% SDS-PAGE. Después del proceso electroforético, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m, (Amersham, UK) Posteriormente, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa en una solución de 2% leche baja en grasas (marca comercial Carnation), en amortiguador TBS-T (0.5 M NaCl, 2.4 mM Tris-base pH 7.5 y 0.01% Tween-20). Luego de incubar durante 12 h, se sustituyó la solución de bloqueo por TBS-T, y se incubó nuevamente la membrana durante 1 h con el anticuerpo (primario) policlonal anti His6X-FlgP, His6X-FlgP, His6X-FlgP, o His6X-FlgP. Posteriormente se lavó el exceso de anticuerpo con 30 ml de buffer TBS-T y se incubó nuevamente la membrana con el anticuerpo (secundario) anti IgG de ratón, acoplado a fosfatasa alcalina, diluido en solución de TBS-T en una relación 1:30,000, durante 1 h. Después de lavar la membrana con TBS-T en tres ocasiones con 10ml de TBS-T, se incubó la membrana con el sustrato quimioluminisciente CDP-Star (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se detectó la señal luminiscente por medio de una placa radiográfica (KodaK).

Transformación de levaduras

Para introducir los plásmidos pGAL4 en la levadura *S. cerevisiae* AH109. Se prepararon las células de levadura mediante el siguiente protocolo.

A partir de un cultivo de *S. cerevisiae* AH109 crecido durante 12 h en medio YPDA a 30°C con agitación constante de 200 rpm. Se transfirió 1 ml del cultivo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio YPDA y se incubó en las condiciones antes mencionadas, hasta alcanzar una densidad óptica de OD_{600nm} = 0.6 u.a. (4-5 h). Posteriormente, recuperamos las células por centrifugación a 1000 x g por 5 en un tubo estéril. El sobrenadante fue descartado y se procedió a lavar las células con agua estéril en dos ocasiones. Agregando 10 ml de agua desionizada y centrifugando a 1000 x g por 5 min. Finalmente el sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido con el agua remanente en el tubo. La suspensión celular fue transferida a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml (estéril). Nuevamente, se centrifugaron las células por 10 s a 15000 x g.

Con una punta estéril se eliminó el remanente de agua. Inmediatamente el paquete celular fue resuspendido en 500 µl de solución TE/LiAc (Tris 10mM, EDTA 1 mM, LiAc 100mM). Y se dejó a incubar durante 20 min a 30°C, con agitación de 200 rpm. Mientras tanto en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml (estéril), se mezclaron: 100 ng de plásmido de interés o 100 ng de cada uno de los dos plásmidos de interés pGAD-BD y pGAD-AD; 600 µl de la solución PEG/AcLi/TE (PEG-400 50%, Tris 10mM, EDTA 1mM, LiAC 100mM); 1 µg de DNA acarreador o inespecífico, previamente desnaturalizado (Para ello se hirvió la muestra por 5 min y se pasó inmediatamente a hielo durante 5 min). Posteriormente, se agregaron 100 µl de las levaduras en la solución TE/AcLi. Y se agitó suavemente, la mezcla se incubó durante 20 min a 30°C, con agitación de 200 rpm.

Posteriormente, se agregó en la preparación 70 µl de DMSO (dimetilsulfoxido) estéril, se mezcló suavemente y se incubó a 42°C durante 15 min; agitando suavemente la preparación en repetidas ocasiones (3 ocasiones cada 5 min). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el tubo fue colocado en hielo por 2 min. Inmediatamente después se recuperó el contenido celular mediante centrifugación a 15000 x g durante 6 s. Se retiró el excedente de la solución y se resuspendieron las células en 100 µl de medio sintético medio sintético definido, SD (Clontech, Mountain View, CA). Las células se sembraron en placas de agar preparadas con medio sintético SD, suplementadas con 0.64 g/l de DO Leu-Trp (Clontech, Mountain View, CA). Las cajas fueron incubadas

durante 48 h a 30°C.

Purificación de proteínas recombinantes

Se utilizaron los oligonucleótidos 0035fwBad y 0035RvBad para amplificar mediante PCR, la región codificante de *flgP*, eliminando la región que corresponde a la secuencia péptido señal. El producto de amplificación (500pb) se utilizó para clonarlo en el plásmido pBAD-hisB. El plásmido resultante fue introducido en la cepa de *E. coli* LMG194. La cual fue crecida en 50 ml de medio de cultivo LB a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.3 u.a.. En este punto de crecimiento, se agregó una concentración final de arabinosa de 0.2% y se dejó incubar por 6 h a 28°C con agitación constante de 200 rpm. Pasado este tiempo, las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 15000 x g durante 2 min, se descartó el sobrenadante, y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de una solución que contiene 50 mM Tris-HCl, 5% glicerol, 50 mM NaCl, y 1 mg/ml de lisozima (pH 8). Las células en suspensión se mantuvieron en hielo y se sonicó la preparación (Ultrasonic homogenizer, Cole parmer), utilizando tres pulsos de 10 segundos cada uno. Posteriormente, separamos la fracción soluble de los restos celulares por centrifugación a 15000 x g durante 2 min a 4°C. Repetimos este paso al menos tres veces para eliminar la mayor cantidad de restos celulares. La fracción soluble fue mezclada con 20 µl de perlas de agarosa acopladas a níquel-ácido nitriloacético Ni-NTA, (Qiagen), y se incubaron en hielo durante 1 h, mezclando por inmersión (cada 5 min) para evitar el precipitado de las perlas de Ni-NTA. Posterior al tiempo de incubación, las perlas fueron lavadas. Primeramente, se recuperaron por centrifugación 12000 x g durante 5 min, 4°C y posteriormente se lavaron con tres volúmenes de buffer de fosfatos, PBS; pH 7.4 (repetiendo el método de centrifugación). Finalmente, las proteínas fueron eluidas de la perla de Ni-NTA, utilizando 500 µl de buffer PBS conteniendo 20 % glicerol y 200 mM imidazol. Para corroborar el grado de purificación de la proteína His6x-FlgP, la muestra fue sujeta a electroforesis (SDS-PAGE), y el gel fue teñido con solución de 2 % azul de Coomasie R-250, disuelto en 50% metanol y 10% ácido acético.

Para purificar la versión recombinante de la proteína His6x-flgH se amplificó por

PCR el fragmento codificante desde el residuo Ala 58 hasta el codón de paro. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos flgH-pGABfw y flgHpBADB. Posteriormente, el fragmento puro se clonó en el plásmido pET28a. El protocolo de purificación fue muy similar al que se utilizó para la proteína His6X-FlgP, excepto por que en este caso la inducción se realizó mediante la adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.25 mM; la inducción de IPTG se realizó cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600nm} = 0.3$ u.a., posteriormente, se incubó durante 4 h a 28°C.

FlgT-His6X y His6X-MotF fueron purificadas de acuerdo a los procedimientos previamente publicados (Fabela, *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2012). Para obtener la proteína GST-FlgP, se procedió a purificar la región codificante de *flgP* a partir del residuo Ala 58 hasta el codón de paro, utilizando los oligonucleótidos 0035FwpGEX y 0035RvpGEX. El producto de PCR fue clonado en el plásmido pGEX-4T-2. Posteriormente, introdujimos el plásmido resultante en la cepa de *E. coli* Rosetta.

Para la sobreexpresión y purificación de la proteína de interés, se inocularon 30 ml de medio LB (suplementado con antibióticos tabla 2), con la cepa *E. coli* Rosetta y se incubó a 37 °C con agitación constante, 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0.3 u.a., se adicionó IPTG a una concentración final de 0.25 mM. El cultivo se incubó a 30 °C durante 4 h. Pasado este tiempo, las células se recuperaron por centrifugación, 15000 x g durante 2 min y el paquete celular fue resuspendido en buffer de fosfatos PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4 y 0.18 mM KH_2PO_4) adicionado con 20% glicerol (pH 7.2) y 1 mg/ml de lisozima. La suspensión se incubó en hielo durante 1h y posteriormente, se sónico la muestra con tres pulsos de 9 s. Los remanentes celulares fueron eliminados por centrifugación, y la fracción soluble fue incubada durante 1 h en hielo con 100 µl de perlas de agarosa acopladas a glutatión. Posteriormente, recuperamos las perlas de agarosa mediante centrifugación a 13000 x g durante 5 min a 4°C, y lavamos las perlas con 3 volúmenes de solución de fosfatos PBS, epitiendo el proceso de centrifugación (13000 x g durante 5 min a 4°C). Finalmente, la proteína fue eluída con 500 µl de buffer, conteniendo 50 mM Tris-HCl, y 10 mM glutatión reducido (pH 8). La versión recombinante de GST fue purificada utilizando la misma metodología.

Obtención de Anticuerpos anti-FlgP y anti-FlgH

Siguiendo la metodología reportada por Harlow y Lane (1988). Se generaron anticuerpos poli clonales inespecíficos contra las proteínas recombinantes His6xFlgP y His6xFlgH. Se inmunizaron 6 ratones de la cepa BALB/c hembras con 20 µg de las proteínas His6xFlgP o His6xFlgH, en ambos casos, la preparación de las proteínas incluyó, en proporción 1:1, adyuvante de Freund. Posterior a la primera inmunización de los ratones, se realizaron dos refuerzos a los 28 y 40 días. Posteriormente se recolectó la sangre de los ratones en tubos de microcentrifuga y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Finalmente, el suero se recuperó mediante centrifugación a 15000 x g por 10 min a 4°C.

Microscopía

Se colocaron 2 µl de muestra de los diferentes tratamientos celulares de *R. sphaeroides*, tinciones DAPI o inmufluorescencia-FlgE, sobre porta objetos previamente cubiertos con 0.75 ml de 0.75% agarosa, disuelta en medio SIS. Las imágenes de epifluorescencia fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E600 acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-ER. Para visualizar la epifluorescencia se expuso la muestra teñida con DAPI durante 1 segundo, mientras que las preparaciones de inmunofluorescencia contra la proteína del gancho FlgE, se expusieron durante 3 s.

Microscopía electrónica de transmisión

Se colocaron 10 µl de la muestra correspondiente a los flagelos (filamentos- cuerpos basales) aislados en una rejilla cubierta con carbón, (previamente ionizada). Posteriormente, se tiñó la preparación con 1% ácido fosfotúngstico (pH 7) y se llevaron a un microscopio electrónico JEM-1200EX (Jeol, Tokio). Las micrografías se tomaron utilizando una cámara digital Gatan manteniendo un voltaje de aceleración igual a 80 kV

Gel azul, Blue Native PAGE.

Soluciones y reactivos utilizados

Tabla 3

Reactivo o solución	acrilamida (H%) 12%	acrilamida (L%) 4%	gel concentrador 4%
48.5% acrilamida	4.6 ml	1.52 ml	0.50 ml
1.5% bis-acrilamida			
Amortiguador para el gel 3X	6.2 ml	6.2 ml	2 ml
Glicerol 80%	4.73 ml	1.2 ml	
H2O destilada	3.04 ml	9.38 ml	3.44 ml
TEMED	18 µl	18 µl	9 µl
Persulfato de amonio (10%) (APS)	50 µl	50 µl	32 µl

Amortiguador para gel 3X pH 7.0 HCL (100 ml)

Ácido amino-caproico 1.5M (19.68 g)

Bis-tris /imidazol 150/75 mM (3.14/0.51 g)

Amortiguador del cátodo 1 L

Tricina 50 mM (8.96 g)

Bis-tris /imidazol 15/7.5 mM (3.14/ 0.51 g)

Azul de coomassie ®Serva G-250. 0.02% (200 mg)

Amortiguador del ánodo 1 L

Bis-tris /imidazol 50/25mM (10.46/ 1.7 g)

Ajustar pH7.0 HCL

Amortiguador de carga coomassie Serva blue G 1 ml

Azul de coomassie Serva G-250 5% (50 mg)

Disolver en 1ml de amortiguador de la muestra

Previamente se realizaron geles de acrilamida por gradiente 4 a 12% acrilamida, de 27x24 cm y 1.5 mm de espesor. Para la preparación del gel realizamos el siguiente procedimiento.

Preparar las soluciones para el gel de separación, 4 y 12% y para el gel concentrador 4%, en presencia de TEMED.

Se agregaron las soluciones en un formador de gradientes colocado sobre un agitador magnético sobre una plataforma ajustable. La salida del formador de gradientes debe estar al menos 10 cm por arriba de las placas de vidrio. Nos aseguramos de tener cerradas las dos válvulas del formador de gradiente antes de agregar las soluciones. Colocamos la solución de alta concentración de acrilamida en el cilindro más cercano a la salida, donde se colocó un agitador magnético. Por otro lado, se adiciono el APS a la solución de baja concentración de acrilamida, se mezcló y coloco inmediatamente en el contenedor del formador de gradiente. A partir de este momento, debe trabajarse rápidamente, para evitar la polimerización prematura al gradiente deseado. Se agregó el APS a la solución de alta concentración de acrilamida y se homogeneizo mediante agitación. Se mantuvo una agitación de baja velocidad (mezclar fuertemente impide el flujo de la solución de baja concentración en la de alta concentración). Inmediatamente después, se abrió la válvula entre los cilindros y posteriormente abrimos la válvula de salida, la cual conectamos con manguera a entre los cristales (molde). Una vez que todo el contenido de acrilamida ha sido depositado en los cristales, se cubrió la superficie de acrilamida con etanol y se dejó hasta que la reacción polimerizo, aproximadamente 45 min. Una vez que la acrilamida polimerizo por completo, se retiraron los residuos de etanol con agua destilada y se secó el excedente de agua con papel filtro. Posteriormente, se agregó el APS a la solución de gel concentrador y colocamos el volumen de la solución hasta llegar al borde de los cristales. Finalmente se colocó el peine para moldear los pozos de carga.

Cargado y corrida del gel Blue Native PAGE

Previamente, se dializo durante 12 h un total de 100 µg de His6x-FlgP, FlgT-His6x o la mezcla de ambas proteínas en solución de fosfatos PBS, a 4°C. Posteriormente, cada muestra se mezcló con amortiguador de carga, en una relación 1:1 y fue colocada en el gel de acrilamida (gradiente 4 a 12% acrilamida). Las muestras fueron colocadas en condiciones electroforéticas siguiendo la metodología propuesta por Schagger et al., 1994. Posteriormente, los carriles de gel que contienen a las proteínas fueron recortados y colocados cada uno sobre geles de 14% acrilamida para realizar un procedimiento electroforético en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Finalmente, los geles obtenidos fueron teñidos con solución de Coomassie.

Ensayo de coprecipitación

Las perlas de agarosa acopladas a glutatión, previamente cargadas con 5 µg de GST-FlgP o GST (incubadas sin agitación a 4°C durante 1 h), se mezclaron con FlgT-His6X manteniendo una concentración molar 1:1, el volumen fue ajustado a 250 µl con PBS que fue adicionado con 10% glicerol y 3% BSA. La mezcla fue incubada durante 2 h a 4°C, invirtiendo la suspensión manualmente, aproximadamente cada 10 min. Posteriormente, las perlas de agarosa fueron recuperadas por centrifugación a 13000 x g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las perlas fueron lavadas 3 veces con 1 ml de PBS. Posteriormente, se eluyó el contenido proteico con 100 µl de solución amortiguador que contiene 100 mM Tris-HCl (pH 8) y 10 mM de L-glutatión reducido. Después de 10 min de incubación, la muestra fue centrifugada durante 1 min a 13000 x g a 4°C. Finalmente una alícuota de 10 µl del sobrenadante fue analizada por western blot utilizando anticuerpos α-penta-His (Qiagen).

Ensayo de Far western.

Se utilizaron 5 µg de His6X-FlgP, His6x-FlgH y His6x-GFP para mezclar con un volumen igual de solución 2X de Laemmli con 2% β-mercaptoetanol. La muestra fue colocada en un gel de 12% acrilamida y se procedió a realizar la electroforesis.

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , (Amersham, UK) siguiendo la metodología Harlow y Lane (1988). Posteriormente, se colocó la membrana en solución de bloqueo 5% leche baja en grasas (marca comercial Carnation), en amortiguador TBS-T (0.5 M NaCl, 2.4 mM Tris-base pH 7.5 y 0.01% Tween-20) durante 1 h.

Posteriormente, la membrana fue incubada con 17 μg de proteína pura GST-FlgP o GST en la misma solución de bloqueo durante 1 h en agitación constante. La membrana fue lavada tres veces con buffer TBS, a intervalos de 5 min. Posteriormente, se incubó la membrana con anticuerpos α -FlgP o α -GFP durante 1 h. La membrana fue lavada con buffer TBS tres veces cada 10 min. Se incubó agregando el anticuerpo secundario α -mouse AP (Sigma-Aldrich. 1:30000) durante 45 min. La membrana fue incubada con sustrato quimioluminiscente CDP-star (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La generación de la señal luminiscente fue visualizada a través de una placa radiográfica a diferentes exposiciones.

Ensayo de doble híbrido con levaduras

Para evaluar la interacción de las proteínas FlgP, FlgT, y FlgH, se utilizó el sistema de doble híbrido Matchmaker GAL4 (Clontech, 2010). Los plásmidos de fusión que incluyen a la proteína FlgT, y que son: pGBD-FlgT y pGAD-FlgT, fueron tomados de la colección del laboratorio, ya que fueron utilizados previamente (Fabela et al., 2013).

Se utilizaron los oligonucleótidos 0035fwpGA-pGB y 0035rvBAD para amplificar la región codificante de FlgP, a partir del residuo A13 y hasta el codón de paro. Posteriormente, este producto se clonó en los plásmidos pGADT7, que codifica el dominio de activación de Gal4 (AD), y pGBKT7, que codifica el dominio de unión a DNA (BD) de Gal4. Los plásmidos resultantes pGAD-FlgP y pGBD-FlgP fueron introducidos en la cepa AH109 de acuerdo a los protocolos publicados (Clontech, 2010). Del mismo modo, se amplificó mediante PCR la secuencia nucleotídica del gen *flgH* a partir del residuo A13 hasta el codon de paro. El producto puro de PCR se clonó en los plásmidos pGADT7 y pGBKT7.

Los plásmidos fueron introducidos en la cepa AH109 siguiendo el protocolo de transformación de levaduras descrito anteriormente. Para evaluar la interacción de FlgP

con FlgT, se introdujeron los plásmidos pGAD-FlgP y pGBD-FlgT en la cepa AH109. Los plásmidos pGAD-FlgP y pGBD-FlgH, se utilizaron para evaluar la interacción entre FlgP y FlgH. Por otro lado, pGBD-FlgH y pGBD-FlgT fueron utilizados para evaluar la interacción entre FlgH y FlgT. Las cepas transformantes denominadas AH109/AD_FlgP+BD_FlgT, AH109/AD_FlgP+BD_FlgH, AH109/AD_FlgH+BD_FlgT, fueron crecidas en medio mínimo sintético definido (SD), sin leucina (Leu) y sin triptofano (Trp) pero adicionado con 0.2% histidina (His) y 0.1% adenina (Ade). Una vez crecidas a una densidad óptica de $DO_{600nm} = 2$ u.a., se prosiguió a lavar los paquetes celulares con medio mínimo SD libre de suplemento y se normalizaron los cultivos celulares a una $DO_{600nm} = 0.5$ u.a.. Inmediatamente, se realizaron diluciones seriales de 10 veces en el mismo medio sintético. A partir de estas diluciones, se sembraron por duplicado, alícuotas de 5 μ l en placas selectivas preparadas con medio SD libre de Trp y Leu (control de crecimiento y presencia de plásmidos), SD libre de Trp, Leu e His (astringencia media) o SD libre de Trp, Leu, His y Ade (astringencia alta). Luego de incubar las placas a 30°C se evaluó la capacidad de interacción de las proteínas, a partir de la capacidad de crecimiento de los inóculos de levadura a los 7 y 15 días posteriores.

Referencias

- Aizawa SI, 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*. 19(1): 1-5.
- Aldridge P, Hughes KT. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Current opinion in Microbiology*. 5 (2): 160-5.
- Andrews DA, Nesmelov YE, Wilce MC, Roujeinikova A. 2017. Structural analysis of variant of *Helicobacter pylori* MotB in its activated form, engineered as chimera of MotB and leucine zipper. *Nature Scientific Reports*. 7 (1): 13435.
- Armitage JP, Pitta TP, Vigeant MA, Packer HL, Ford RM. 1999. Transformations in flagellar structure of *Rhodobacter sphaeroides* and possible relationship to changes in swimming speed. *Journal of Bacteriology*. 181 (16): 4825-4833.
- Asai Y, Kojima S, Kato H, Nishioka N, Kawagishi I, Homma M. 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *Journal of Bacteriology*. 179 (16): 5104-5110.
- Atsunami H, Yoon Y, Meshchryakov V, Namba K, Samatey F. 2016. Structural flexibility of the periplasmic protein, FlgA, regulates flagellar P-ring assembly in *Salmonella enterica*. *Nature Scientific reports* 7(6):27399.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York.
- Ballado T, Camarena L, Gonzalez B, Silva E, Dreyfus G. 2001. The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *Journal of Bacteriology* 183 (5): 1680–1687.
- Beeby M, Ribardo DA, Brennan CA, Ruby EG, Jensen GJ, Hendrixson DR. 2016. Diverse high-torque bacterial flagellar motors assembly wider stator using a conserved protein scaffold. *PNAS* 113(13):1917-113.
- Belas R, Horikawa E, Aizawa S, and Suvanasuthi R. 2009. Genetic determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. *Journal of Bacteriology*. 191 (14):4502–4512.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 62 (3): 293-300.
- Bonifield HR, Yamaguchi S, Hughes KT. 2000. The flagellar hook protein, FlgE, of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is posttranscriptionally regulated in response to the stage of flagellar assembly. *Journal of Bacteriology* 182(14): 4044-50.
- Boyer HW y Roulland-Dussoix D. 1969. A complete analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41(3): 459:472.
- Brand J, Smith ES, Schwefel D, Lapatsina L, Poole K, Omerbašić D, Kozlenkov A, Behlke J, Lewin GR, Daumke O. 2012. A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. *The EMBO Journal* 31 (17):3635–3646.
- Braun TF, Al-Mawsawi LQ, Kojima S, Blair DF. 2004. Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43(1): 35-45.
- Brown MT, Steel BC, Silvestrin C, Wilkinson DA, Delalez NJ, Lumb CN, Obara B, Armitage JP, Berry RM. 2012. Flagellar hook flexibility is essential for bundle formation in swimming *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology* 194(13):3495-501.
- Braun TF and Blair DF. 2001. Targeted Disulfide Cross-Linking of the MotB Protein of *Escherichia coli*: Evidence for Two H+ Channels in the Stator Complex. *Biochemistry* 40 (43), 13051-13059.
- Chaban B, Coleman I, Beeby M. 2018. Evolution of higher torque in *Campylobacter*-type bacterial flagellar motors. *Nature Scientific Reports* 8:97.
- Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, Li Z, Shi J, Tocheva EI, Muller A, Dobro MJ, Jensen GJ. 2011. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *The EMBO Journal* 30 (14):2972–2981.

- Chevance FF, Hughes K T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology* 6 (6): 455–465.
- Chevance F, Chevence V, Takahashi N, Karlinsey J E, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, Aizawa SI, Hughes KT. 2007 The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes and Development*. 21 (18): 2326–2335.
- Clayton RK, Sistrom WR. 1978 *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press.
- Clontech. 2010. Yeastmaker™ Yeast transformation system 2 user manual. Clontech.
- Cohen EJ, Hughes KT. 2014. Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. *Journal of Bacteriology* 196 (13):2387–2395.
- Del Campo AM, Ballado T, de la Mora J, Poggio S, Camarena L, Dreyfus G. 2007 Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FlIM proteins. *Journal of Bacteriology* 189(22):8397-401.
- De la Mora J, Uchida K, Del Campo AM, Camarena L, Aizawa S, Dreyfus G. 2015. Structural characterization of the Fla2 flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*. 197 (17):2859-66.
- Dean GD, Macnab R M, Stander J, Matsumura P, Burks C. 1984. Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 159(3):991-999.
- Erhardt M, Namba K, Hughes KT. 2010. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*. 2 (11):000299.
- Fabela S, Domenzain C, De la Mora J, Osorio A, Ramirez V, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2013. A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FlIL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 195 (23):5285–5296.
- Fahrner K, Block S, Krishnaswamy S, Berg H. 1994. A mutant hook associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 238 (2): 173-186.
- Falke J J, Bass RB, Butler SL, Chervitz SA, Danielson MA. 1997. The two component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases and adaptation enzymes. *Annual Review Cell and Developmental Biology*. 13: 457-512.
- Genetet S, Desrames A, Chouali Y, Ripoche P, Lopez C, Mouro I. 2017. Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1). *Nature Scientific Reports* 7: 46170.
- Gonzalez B, De la Mora J, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G. 2002. Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochimica Biophysica Acta* 1579 (1):55– 63.
- Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies a laboratory manual*. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor laboratory press.
- Hernandez J, Domenzain C, de la Mora J, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2017. The master regulators of the Fla1 and Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate CheY proteins. *Journal of Bacteriology* 199 (5) a00670-16.
- Hirano T, Yamaguchi S, Oosawa K, Aizawa SI. 1994. Roles of FlIK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176 (17): 5439– 5449.
- Homma M, DeRosier DJ, Macnab RM. 1990 Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *Journal of Molecular Biology*. 213 (4): 819–32.
- Homma M, Kutsukake K, Mitsuyasu H, Mitsuyasu I, Macnab RM. 1990 FlgB, FlgC, FlgF and FlgGA Family of Structurally Related Proteins in the Flagellar Basal Body of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*. 211(2): 465-477.

- Homma M, Fujita H, Yamaguchi S, Iino T. 1984. Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *Journal of Bacteriology* 159 (3) 1056–1059.
- Holt SC. 1978. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 42 (1) 114-160.
- Hosogi N, Shigematsu H, Terashima H, Homma M, Nagayama K. 2011. Zernike phase contrast cryo-electron tomography of sodium-driven flagellar hook-basal bodies from *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Structural Biology* 173(1): 67–76.
- Hosking ER, Vogt C, Bakker EP, Manson MD. 2006. The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *Journal of Molecular Biology*. 364 (5) 921–937.
- Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262 (5137): 1277–1280.
- Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, de Beyer JA, Godfrey SA, Armitage JP. 2009. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (20):6613– 6615.
- Jenal U, White J, Shapiro L. 1994. *Caulobacter* flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. *Journal of Molecular Biology*. 243 (4):227–244.
- Jones CJ, Macnab RM. 1990. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *Journal of Bacteriology* 172 (3):1327–1339.
- Jones C, Macnab RM, Okino H, Aizawa SI. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology* 215 (2): 377-387.
- Jones CJ, Homma M, Macnab RM. 1989. L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *Journal of Bacteriology* 171(7):3890-3900.
- Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. 2003 Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*. 12(8):1652-62.
- Kaplan M, Ghosal D, Subramanian P, Oikonomou CM, Kjaer A1, Pirbadian S, Ortega DR, Briegel A, El-Naggar MY, Jensen GJ. 2019. The presence and absence of periplasmic rings in bacterial flagellar motors correlates with stator type. *eLife* 8: e43487.
- Katayama E, Shiraishi T, Oosawa K, Baba N, Aizawa SI. 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. *Journal of Molecular Biology*. 255 (3): 458-475.
- Katsukake K. 1997. Autogenous and global control of the flagellar master operon *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics*. 254 (4): 440-448.
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. Improved broadhost-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191–197.
- Kihara M, Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM. 2001. Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *Journal of Bacteriology*. 183 (5): 1655–1662.
- Kojima S, Takao M, Almira G, Kawahara I, Sakuma M, Homma M, Kojima C, Imada K. 2018. The Helix Rearrangement in the Periplasmic Domain of the Flagellar Stator B Subunit Activates Peptidoglycan Binding and Ion Influx. *Structure*. 26 (4):590-598.
- Kojima S, Imada K, Sakuma M, Sudo Y, Kojima C, Minamino T, Homma M, Namba K. 2009 Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Molecular Microbiology*. 73(4) 710–718.
- Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*. 226 (2):433-446.
- Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 172(2): 741-747

- Lin TS, Zhu S, Kojima S, Homma M, Lo CJ. 2018 FliL association with flagellar stator in the sodium-driven *Vibrio* motor characterized by the fluorescent microscopy. *Nature Scientific Reports*. 8(1):11172.
- Liu R, Ochman H. 2007 Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *PNAS* 104 (17): 7116-7121.
- Lloyd SA, Tang H, Wang X, Billings S, Blair D F. 1996. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: Evidence of a direct role for FlgG but not for FlgM or FlgN. *Journal of Bacteriology*. 178 (1): 223–231.
- Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology* 57:77-100.
- Martinez RM, Jude BA, Kirn TJ, Skorupski K, Taylor RK. 2010. Role of FlgT in anchoring the flagellum of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 192 (8):2085–2092.
- Martinez RM, Dharmasena MN, Kirn TJ, Taylor RK. 2009. Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *Journal of Bacteriol* 191 (18):5669 –5679.
- Matsunami H, Barker CS, Yoon YH, Wolf M, Samatey FA. 2016. Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions. *Nature communications*. 7:13425
- Mc Carter LL. 2006. Regulation of flagella. *Current Opinion in Microbiology*. 9(2):180-6
- Merino S, Tomás JM. 2016. The FlgT protein is Involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagella stability and not affects anchorage of lateral flagella. *Frontiers in Microbiology*. 26(7):1150
- Minamino T, and Imada K. 2015. The bacterial flagellar motors and its structural diversity. *Trends in Microbiology*. 23 (5): 267-274
- Minamino T, and Macnab RM. 1999. Components of the *Salmonella flagellar* export apparatus and classification of export substrates. *Journal of Bacteriology* 181(5):1388-1394.
- Morris DC, Peng F, Barker JR, Klose KE. 2008. Lipidation of an FlrC dependent protein is required for enhanced intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 190 (1):231–239.
- Morimoto Y, and Minamino T. 2014. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* 4(1):217-234.
- Morimoto Y, Nakamura S, Hiraoka KD, Namba K, Minamino T. 2013 Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FlgG interface in bacterial flagellar motor rotation. *Journal of Bacteriology*. 195(3): 474-481.
- Morimoto YV, Che YS, Minamino T, Namba K. 2010 Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pH luorin expressed in *Salmonella*. *FEBS letters*. 584(6):1268–1272.
- Nambu T, Kutsukake K. 2000. The *Salmonella* FlgA protein, a putativeve periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* 146 (5): 1171-8.
- Okabe M, Yakushi T, Homma M (2005) Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum. *Journal of Biological Chemistry* 280(27):25659–25664.
- Okino H, Isomura M, Yamaguchi S, Magariyama Y, Kudo S, Aizawa SI. 1989. Release of flagellar filament-hook-rod complex by a *Salmonella typhimurium* mutant defective in the M ring of the basal body. *Journal of Bacteriology* 171 (4):2075–2082.
- Patterson J, Martinez RJ, Stocker BA, and Yamaguchi S. 1973. A new fla gene in *Salmonella typhimurium*—flaR—and its mutant phenotype—superhooks. *Archiv fur Mikrobiologie* 90(2): 107–120.
- Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 189 (8):3208 –3216.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer binding proteins. *Molecular Microbiology* 58(4):969 –983.

- Poggio S, Aguilar C, Osorio A, Gonzalez-Pedrajo B, Dreyfus G, Camarena L. 2000. σ^{54} promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 182(20): 5787–5792.
- Quandt J, Hynes MF. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15–21.
- QIAquick Spin Handbook, (2003) QIAGEN.
- Ramirez V, Poggio S, Domenzain C, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2012. A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. *Journal of Bacteriology* 194 (22):6174–6183.
- Raha M, Sockett H, and Macnab RM. 1994. Characterization of the flil gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176(8):2308–2311.
- Reid SW, Leake MC, Chendler JH, Lo C, Armitage J, Berry R. 2006. The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *PNAS* 103(21): 8066-8071.
- Samatey FA, Matsunami, Hideyuki M. Imada K, Nagashima S, Shaikh T, Thomas D, Chen J. Derosier D, Kitao A, Namba K. 2004 Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* 431:1062-8.
- Sarkar MK, Paul K, and Blair D. (2010) Subunit organization and reversal-associated movements in the flagellar switch of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 285(1): 675-684.
- Schagger H, Cramer WA, Von Jagow G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217(2):220–230.
- Schoenhals GJ, and Macnab RM. 1999. FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology* 145(7):1769–1775.
- Segura A, Duque E, Hurtado A, Ramos JL. 2001 Mutations in genes involved in the flagellar export apparatus of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain impair motility and lead to hypersensitivity to toluene shocks. *Journal of Bacteriology*. 183 (14) 4127-33.
- Seydel A, Gounon P, Pugsley AP. 1999. Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Molecular Microbiology*. 34(4):810-21.
- Silverman M, & Simon M. 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* 249, 7374.
- Simon R, Priefer U, Puhler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology* 1:37–45.
- Sistrom WR 1962. The kinetics of the synthesis of phtopigments in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of General Microbiology*. 28: 607-616.
- Sockett RE, Foster JC, Armitage JP. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *Molecular Biology of Membrane Bound Complex in Phototrophic Bacteria* 53:473–479.
- Sommerlad SM, Hendrixson DR. 2007. Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*. 189(1): 179-186.
- Suaste F, Domenzain C, Mireles JC, Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2010. The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*. 192 (23): 6230-6239.
- Terahara N, Sano M, Ito MA. 2012. *Bacillus* flagellar motor that can use both Na⁺ and K⁺ as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na⁺. *PLoS One*. 7(9): e46248.

- Takekawa N, Isumi M, Terashima H, Zhu S, Nishino Y, Sakuma M, Kojima S, Homma M, Imada K. 2019 Structure of *Vibrio* FliL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function. *MBio*. 10(2): 19;10.
- Terashima H, Kawamoto A, Morimoto YV, Imada K, Minamino T. 2017. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophysics and Physicobiology* 14:191–198.
- Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M. 2010. The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *Journal of Bacteriology* 192(21):5609-5615.
- Terashima H, Kojima S, Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *International Review of Cell Molecular Biology* 270: 39–85.
- Terashima H, Fukuoka H, Yakushi T, Kojima S, 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. *Molecular Microbiology*. 62(4):1170-1180.
- Tsang J, Hoover TR. 2014. Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. Hindawi Publishing Corporation Scientifica 2014.
- Vega B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro R, Gomez E, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2015. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *Journal of Bacteriology* 197(5):833– 847.
- Woese CR, Weisburg WG, Paster BJ, Hahn C, Tanner RS, Krieg NR, Kooops HP, Harms H, Stackebrandt E. 1984 The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* 5(3): 315- 326.
- Yonekura K, Maki S, Morgan DM, DeRosier D, Vonderviszt F, Imada K, Namba K. 2000. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* 290(5499):2148-52.
- Zhu S, Nishikino T, Kojima S, Homma M, Liu J. 2018. The *Vibrio* H-Ring facilitates the outer membrane penetration of the polar sheathed flagellum. *Journal of Bacteriology*. 200 (21)00387-18.
- Zhu S, Nishikino T, Hu B, Kojima S, Homma M, Liu J. 2017. Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(41):10966–10971.
- Zhou J, Lloyd S A, and Blair D F. 1998. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):6436-644.



Characterization of FlgP, an Essential Protein for Flagellar Assembly in *Rhodobacter sphaeroides*

Caleb Pérez-González,^a Clelia Domenzain,^b Sebastian Poggio,^a Diego González-Halphen,^b Georges Dreyfus,^b
 Laura Camarena^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^bInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT The flagellar lipoprotein FlgP has been identified in several species of bacteria, and its absence provokes different phenotypes. In this study, we show that in the alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*, a $\Delta flgP$ mutant is unable to assemble the hook and the filament. In contrast, the membrane/supramembrane (MS) ring and the flagellar rod appear to be assembled. In the absence of FlgP a severe defect in the transition from rod to hook polymerization occurs. In agreement with this idea, we noticed a reduction in the amount of intracellular flagellin and the chemotactic protein CheY4, both encoded by genes dependent on σ^{28} . This suggests that in the absence of *flgP* the switch to export the anti-sigma factor, FlgM, does not occur. The presence of FlgP was detected by Western blot in samples of isolated wild-type filament basal bodies, indicating that FlgP is an integral part of the flagellar structure. In this regard, we show that FlgP interacts with FlgH and FlgT, indicating that FlgP should be localized closely to the L and H rings. We propose that FlgP could affect the architecture of the L ring, which has been recently identified to be responsible for the rod-hook transition.

IMPORTANCE Flagellar based motility confers a selective advantage on bacteria by allowing migration to favorable environments or in pathogenic species to reach the optimal niche for colonization. The flagellar structure has been well established in *Salmonella*. However, other accessory components have been identified in other species. Many of these have been implied in adapting the flagellar function to enable faster rotation, or higher torque. FlgP has been proposed to be the main component of the basal disk located underlying the outer membrane in *Campylobacter jejuni* and *Vibrio fischeri*. Its role is still unclear, and its absence impacts motility differently in different species. The study of these new components will bring a better understanding of the evolution of this complex organelle.

KEYWORDS bacterial flagellum, FlgH, FlgJ, FlgP, L ring, *Rhodobacter sphaeroides*, flagellar basal disk, outer membrane, rod-hook transition

The bacterial flagellum is a rotary nanomachine embedded in the cell envelope. The motor is powered by the electrochemical ion gradient formed across the cytoplasmic membrane. The rotating part has three well-defined structures: the basal body, which expands from the cytoplasm to the outer membrane; the hook that is the first extracellular structure; and the helical filament that thrusts the cell forward through rotation of the flagellar motor (1, 2). The rotor is surrounded by a stator formed by multiple transmembrane subunits of MotA/MotB, or PomA/PomB in bacteria with H⁺- or Na⁺-driven motors, respectively (3–7). These proteins form a channel that conveys ions across the membrane and couples ion flow to rotation (8–10). In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (from here on *Salmonella*), the basal body is formed by four rings and a rod that expands from the cytoplasm to the outer

Citation Pérez-González C, Domenzain C, Poggio S, González-Halphen D, Dreyfus G, Camarena L. 2019. Characterization of FlgP, an essential protein for flagellar assembly in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 201:e00752-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00752-18>.

Editor Ann M. Stock, Rutgers University-Robert Wood Johnson Medical School

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Georges Dreyfus, gdreyfus@ifc.unam.mx, or Laura Camarena, rosall@servidor.unam.mx.

Received 6 December 2018

Accepted 12 December 2018

Accepted manuscript posted online 17 December 2018

Published 31 January 2019

membrane (OM), while the membrane/supramembrane (MS) ring is formed by 26 subunits of FliF that is located at the inner membrane (IM) (11, 12). At the cytoplasmic side the MS ring connects with the C-ring that is formed by FliG, FliM, and FliN; these proteins have been implicated in torque generation and morphogenesis (13–15). The periplasmic side of the MS ring couples with the flagellar rod through the adaptor protein FliE (16, 17). The rod formed by FlgB, FlgC, FlgF, and FlgG spans the cell wall and the OM crossing the P and L rings, which act as bushings for the rotating rod (18–21). FlgI and FlgH form the P and L rings, respectively (22). It has been recently proposed that L-ring formation contributes to dislodging the scaffolding protein FlgJ from the tip of the growing rod; this enables the transition from rod to the polymerization of the hook (23). The hook is the first extracellular structure, and it is formed by approximately 120 subunits of FlgE. The flagellar filament is formed by thousands of flagellin subunits and connects to the hook by means of the hook-associated proteins FlgK and FlgL (12, 24, 25).

Recently, electron cryotomography (ECT) of cells from different bacterial species allowed *in situ* visualization of the intact flagellum. These studies have revealed that the basal body has a central core structure that is conserved; however, around it a great diversity of additional components were observed (5, 7, 26, 27). The protein composition of these additional elements is still mostly unknown. In this regard, it has also been recognized that the presence of certain flagellar proteins is restricted to specific bacterial groups, and their characterization is incipient. This is the case for FlgT and FlgP, which are both absent in *E. coli* and *Salmonella*. FlgT is present in several species of *Vibrio* and *Aeromonas*, whereas FlgP has been reported to be present in species of *Vibrio* and in *Campylobacter jejuni* (28–32).

FlgT forms the H ring that covers the L and P rings and which is instrumental in supporting the high swimming velocities reported for several species of *Vibrio* (28). FlgP is a lipoprotein that was first identified and characterized in *Vibrio cholerae* and *C. jejuni* (29, 30, 32). In *V. cholerae* the absence of FlgP provokes a reduction in the number of flagellated cells, and morphologically the filaments were shorter than those observed in wild-type cells (29, 32). In contrast, a *flgP* mutant strain of *C. jejuni* was able to assemble a normal flagellum that showed a paralyzed phenotype (Mot⁻) (30). Recently, flagella of a *flgP* mutant of *V. fischeri* and *C. jejuni* were observed by ECT, and the reconstructed images were compared to those of the wild-type cells. It was suggested that FlgP is a component of a structure named basal disk, which seems to be in contact with the OM (7). The basal disk is required to form other flagellar structures such as the medial and proximal rings in *C. jejuni* or to recruit the stator complexes in *V. fischeri* (7). These authors also observed that in the *flgP* mutant of *C. jejuni* the flagellum is formed, which agrees with previous reports; however, in contrast to what had been reported for *V. cholerae*, the *flgP* mutant of *V. fischeri* seldom forms a flagellum (7).

Rhodobacter sphaeroides is an alphaproteobacterium with two different flagellar systems (33). Transcription of the *fla1* set produces a single subpolar flagellum that is expressed constitutively under the growth conditions commonly used in the laboratory (33, 34). The products encoded by the *fla2* set produce several polar flagella (33, 35). However, the expression of the *fla2* genes is achieved only under very particular conditions. Fla2 flagella were detected in a mutant strain lacking the master activator of the *fla1* genes that acquired a gain of function mutation in the histidine kinase CckA (36). Phylogenetic analysis of these flagellar gene systems suggested that the *fla1* set was acquired by *R. sphaeroides* from an ancestral gammaproteobacterium, whereas the *fla2* set is vertically inherited (33).

The *fla1* system of *R. sphaeroides* includes the *flgT* and *flgP* genes. FlgT forms the periplasmic H-ring that covers the P and L rings, similar to the observed situation in *Vibrio* species; however, the phenotype of the *flgT* mutant strain differs from that of these bacteria, given that in *V. cholerae* and *V. alginolyticus* the absence of FlgT results in a reduction of the number of flagellated cells, but in *R. sphaeroides* the absence of FlgT yields a Mot⁻ phenotype, where the flagellum is paralyzed (37–40).

In this study, we characterized FlgP from *R. sphaeroides*. This protein is absolutely required for the assembly of the Fla1 flagellum, and its absence results in the lack of hook and filament. FlgP was detected in isolated wild-type filament basal body structures, and evidence is presented suggesting that FlgP interacts with FlgH and FlgT.

(This study was conducted by C. Pérez-González in partial fulfillment of the requirements for a Doctorado en Ciencias Biomédicas degree from the Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.)

RESULTS

FlgP is required for swimming and filament assembly. In *R. sphaeroides* the gene *flgP* encodes a 177-amino-acid polypeptide. The N terminus shows a short sequence similar to the consensus sequence recognized by the signal peptidase II (SPaseII) that has a predicted cleavage site between Ala20 and Cys21, with Ala at position +2. The identity of the residue at the +2 position after the cleavage site indicates if the polypeptide will be retained at the IM or directed to the OM (41, 42). Therefore, the presence of Ala at this position, suggests that FlgP is localized in the OM (Fig. 1A). This protein shows a 25/27% identity with homologs in *V. cholerae* and *C. jejuni*. In *R. sphaeroides* *flgP* is the first gene of a putative operon formed by *flgP*, *flgT*, *flgA*, *flgM*, and RSWS8N_05380 *orf* (Fig. 1A). The first three genes show overlapping of the translation stop and start codons. *flgT* encodes the protein that forms the H ring, which is present in some bacterial species (28), FlgA is a chaperone that assists in the assembly of the L ring and, FlgM is the anti- σ^{28} factor required to transcribe the late flagellar genes. RSWS8N_05380 encodes a 123-amino-acid protein that has not been reported to be involved in either flagellar biogenesis or swimming.

To characterize the role of FlgP in the flagellar biogenesis of *R. sphaeroides*, a mutant strain in *flgP* ($\Delta flgP::aadA$) was constructed. This mutant was unable to swim and introduction of the plasmid that expresses *flgP* (pRK_ *flgP*) did not restore swimming; however, when the plasmid pRK_ *flgPT* (that drives the expression of *flgP* and *flgT*) was introduced, swimming was recovered (Fig. 1B). These results suggest that the allele $\Delta flgP::aadA$ generates a polar effect on the expression of *flgT*. Nevertheless, the role of FlgP on swimming was clearly appreciated in the $\Delta flgP$ /pRK_ *flgT* strain, since the expression of *flgT* did not restore swimming, suggesting the absence of *flgP* by itself is responsible of this defect. The presence in these strains of FlgP and FlgT was verified by Western blotting (Fig. 1C) and, as expected, FlgT is absent in the strain carrying the $\Delta flgP::aadA$ allele but is present in the nonmotile $\Delta flgP$ /pRK_ *flgT* strain. Furthermore, FlgP was detected in the wild-type strain and also in the $\Delta flgP$ strain harboring pRK_ *flgP* and pRK_ *flgPT* (Fig. 1C). Given that in this bacterium the flagellar hierarchy is controlled by the master activator FleQ (43), the absence of FlgP in the $\Delta fleQ$ mutant strain indicates that *flgP* is expressed as a part of the flagellar regulon (Fig. 1C).

Overlapping of the translation stop and start codons of *flgP*, *flgT*, and *flgA* suggests that these genes form an operon. We noticed that the $\Delta flgP::aadA$ allele affects the expression of *flgT* but not the expression of *flgA*, since the $\Delta flgP::aadA$ /pRK_ *flgPT* strain was fully motile (and the lack of FlgA would have produced a Fla⁻ phenotype). From these observations, it could be hypothesized that the absence of FlgT in the $\Delta flgP::aadA$ mutant could be caused by translational coupling. This possibility would also explain why the insertion of the nonpolar gene *aadA* (44) could affect the expression of the downstream gene; alternatively, in the absence of FlgP, FlgT could be unstable. Unfortunately, several attempts to isolate a *flgP* mutant without a resistance marker were unsuccessful; therefore, we carried out experiments to characterize the $\Delta flgP$ ($\Delta flgP::aadA$) mutant always in the presence of the plasmid pRK_ *flgT*. In this strain the amount of FlgT detected by Western blotting is similar to the amount detected in WS8N (Fig. 1C), suggesting that FlgT should not be limiting for flagellum formation and functioning.

Filaments were easily detected in the microscope in the wild-type strain, but this structure was not observed in $\Delta flgP$ and $\Delta flgP$ /pRK_ *flgT* strains, indicating that these

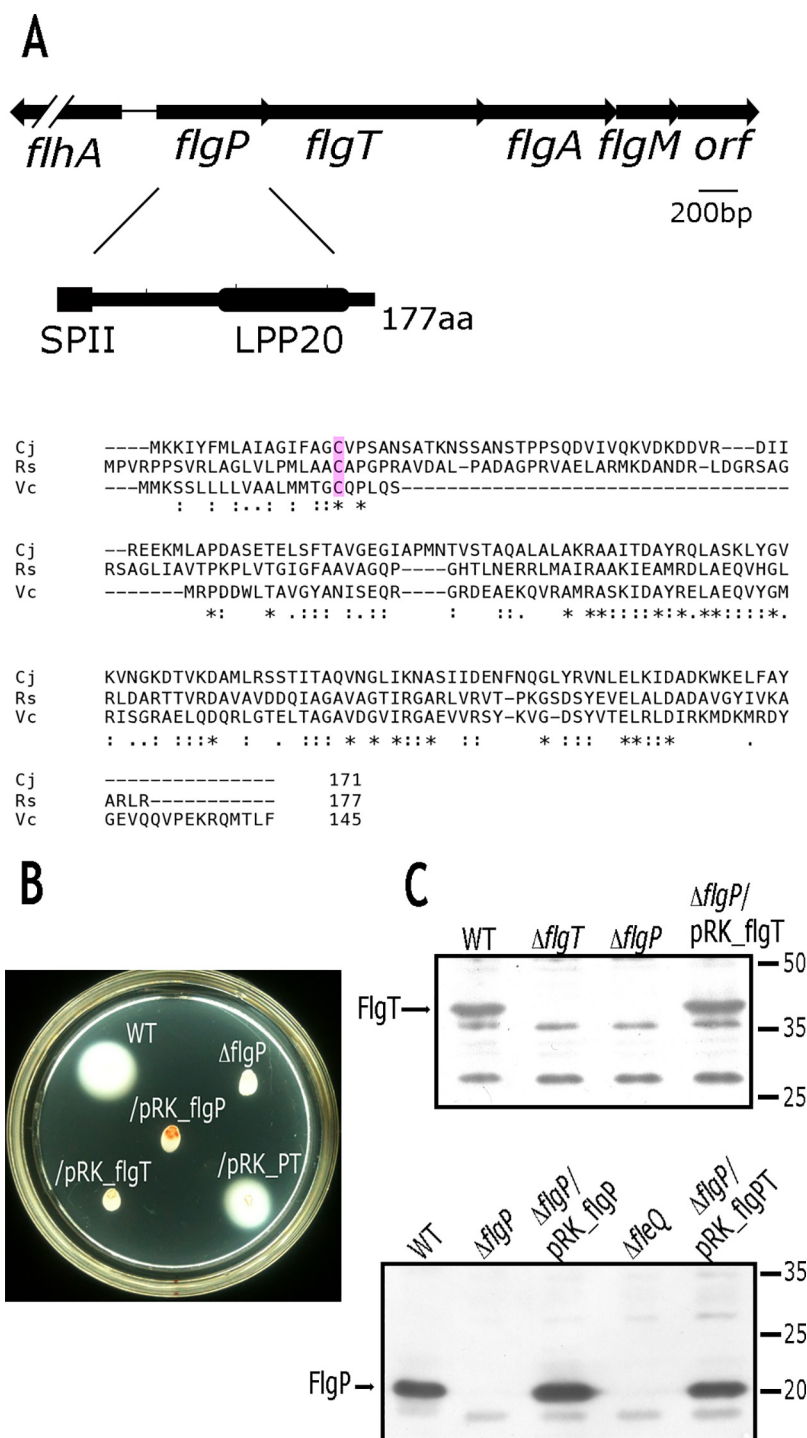


FIG 1 The role of FlgP on swimming in *R. sphaeroides*. (A) Genetic context of *flgP* and domain composition. SPII, signal protease II; LPP20, pfam PF02169. Amino acid sequence alignment of FlgP with homologs from *C. jejuni* and *V. cholerae*. The invariant cysteine in the lipobox is shown in pink. (B) Swimming of the $\Delta flgP::aadA$ mutant and complementation test. (C) Immunodetection of FlgT and FlgP in total cell extracts of the $\Delta flgP::aadA$ mutant and strains expressing FlgP, FlgT, and FlgPT from the promoter of pRK415. WT, wild-type strain WS8N.

two mutant strains are Fla⁻ (Fig. 2). In contrast, the filament was visible in $\Delta flgP/$ pRK_flgP cells. Given that a strain lacking of *flgT* shows a Mot⁻ phenotype (37), the presence of the flagellar filament in the $\Delta flgT$ mutant was expected (Fig. 2). From these results, we conclude that the absence of FlgP causes the loss of the flagellar filament.

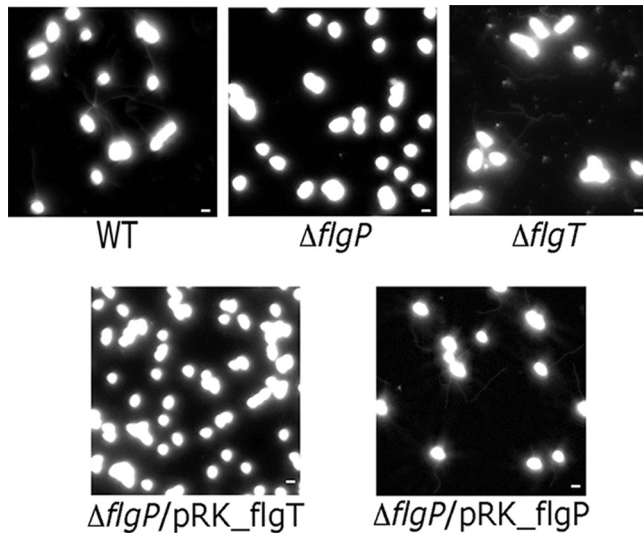


FIG 2 Flagellar filament detection. Cells were stained with DAPI and observed by fluorescence microscopy as indicated in Materials and Methods. WT, wild-type strain WS8N. Scale bars, 1 μm .

This phenotype is different from that reported for *C. jejuni* and *V. cholerae* (29, 30) but is similar to what was observed in *V. fischeri* (7).

Role of FlgP in the formation of other flagellar structures. Given that the flagellar filament is absent in the $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ mutant cells, we proceeded to investigate whether the flagellar hook would be assembled in the absence of FlgP. For this, $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ cells were labeled with an anti-FlgE antibody previously conjugated with Alexa Fluor 488 and then observed by fluorescence microscopy. The hook was readily observed as small fluorescent foci that are placed laterally on wild-type strain cells (Fig. 3A). In contrast, the $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ mutant strain did not show fluorescent foci, indicating that the hook is not formed in the absence of FlgP (Fig. 3A).

A simple explanation for the lack of hook and filament in the $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ strain could be that FlgE and FliC were not being synthesized. This possibility was tested by probing total cell extracts by Western blotting using anti-FliC and anti-FlgE antibodies (Fig. 3B). The intensity of the signal for FlgE was similar in the wild-type cells and $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ mutant, indicating that the absence of the hook is not due to a lack of protein. However, the amount of FliC was severely reduced in the mutant strain ($\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$). This is the logical outcome of a lack of hook, since the anti-sigma factor FlgM cannot be exported from the cells, and transcription by σ^{28} of the late flagellar genes does not take place (43, 45–47). The expression of CheY4 was used to corroborate this notion, given that it is also σ^{28} dependent (48). As expected, a severe reduction in the amount of CheY4 was observed in the $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ strain (Fig. 3B).

In $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ cells, the hook was not detected but FlgE was observed in total cell extracts, raising the possibility that FlgE could be exported from the cell but not assembled. To test this idea, the supernatants of WS8N and $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ cultures were probed by Western blotting for the presence of FlgE. No protein was detected in these samples, indicating that FlgE is not exported (data not shown). As a control, the cells of these cultures were vigorously vortexed to promote the mechanical shearing of the flagella. After centrifugation, the supernatants were tested by Western blotting. In these samples, FlgE was detected in the culture supernatant of WS8N but not in the $\Delta\text{flgP}/\text{pRK_flgT}$ strain (see Fig. S1 in the supplemental material), confirming the notion that, in the absence of FlgP, FlgE is not exported or assembled.

To determine whether the MS ring is formed in the absence of FlgP, we evaluated the localization of the GFP-FliF fusion protein as an indirect evidence of the presence of this structure. As shown in Fig. 4A, GFP-FliF was detected as a single focus in wild-type and ΔflgP cells, suggesting that the formation of the MS ring is not affected by the absence of FlgP.

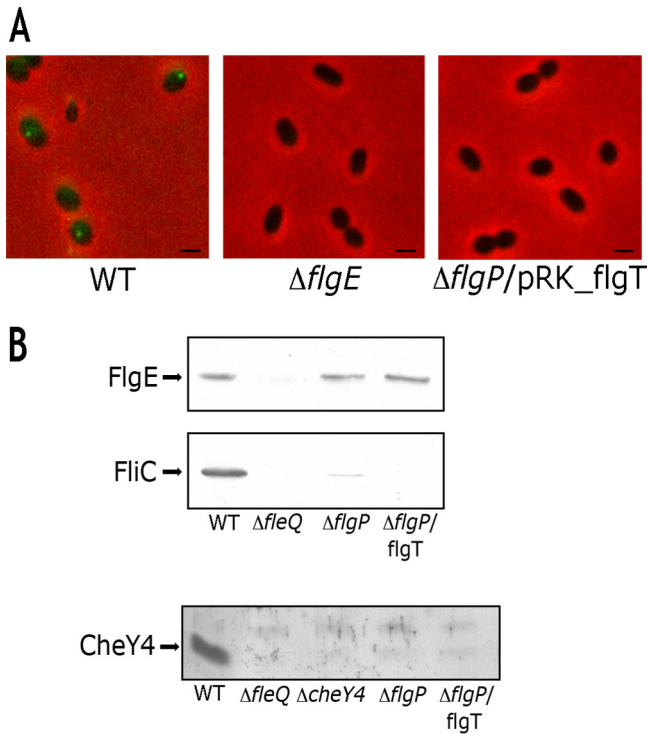


FIG 3 Immunofluorescent detection of the flagellar hook in complete cells. (A) Cells were incubated in the presence of anti-FlgE prestained with Alexa Fluor 488 and observed by fluorescence microscopy. WT, wild-type strain WS8N. Scale bars, 1 μ m. (B) Western blots of total cell extracts of the indicated strains, using anti-FlgE, anti-FliC, and anti-CheY4 antibodies. WT, wild-type strain WS8N.

It has been shown that in *Salmonella* FlgE is degraded in strains where the rod genes have been deleted. This was caused by the high sensitivity of FlgE to periplasmic proteases (49). We tested by Western blot analysis whether FlgE could be detected in rod mutants, type III export apparatus mutants, and the $\Delta flgP/pRK_flgT$ mutant. Total cell extracts of these strains revealed the presence of FlgE in the wild-type strain, in the export apparatus mutants (*fliE*, *fliR*, and *fliO*), and also in the $\Delta flgP$ mutant ($\Delta flgP/pRK_flgT$) and its absence in the rod mutants ($\Delta flgB$ and $\Delta flgC$) (Fig. 4B). A reduction of

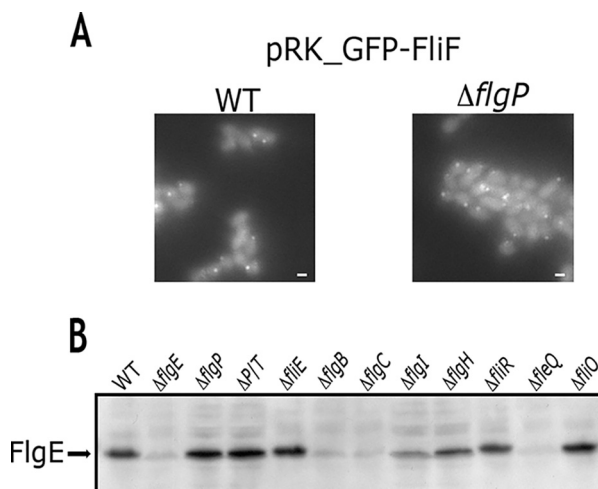


FIG 4 GFP-FliF detection by fluorescence microscopy. (A) Wild-type (WT), WS8N, and $\Delta flgP::aadA/pRK_flgT$ cells. Scale bars, 1 μ m. (B) Immunodetection of FlgE by Western blotting in the indicated genetic background.

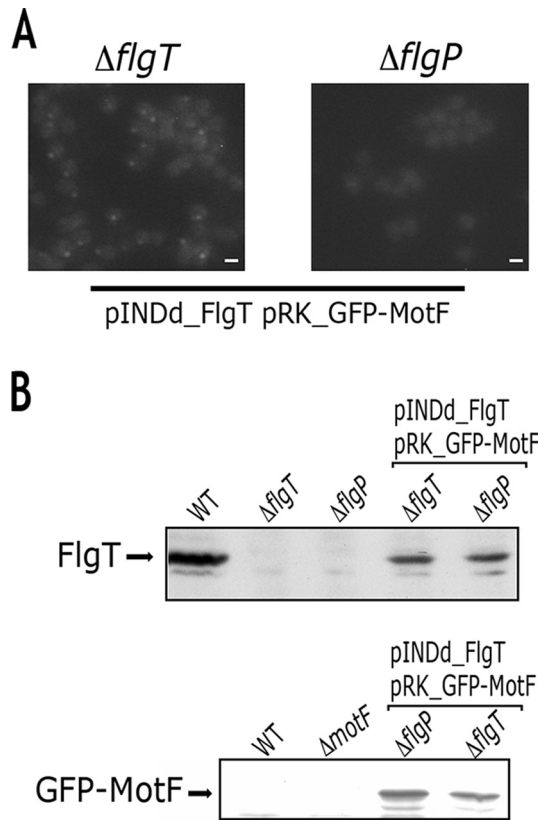


FIG 5 GFP-MotF detection by fluorescence microscopy. (A) Cells expressing FlgT from pINDd and GFP-MotF from pRK415. Scale bars, 1 μ m. (B) Immunoblotting detection of FlgT and GFP-MotF in total cell extracts of the indicated strains. WT, wild-type strain WS8.

FlgE in the $\Delta flgI$ mutant was noted; this is in accordance with the results previously reported for *Salmonella* (49). The mutants lacking the flagellar master regulator, *fleQ*, and the hook gene *flgE* were included as negative controls. The presence of FlgE in $\Delta flgP$ /pRK_flgT cells (Fig. 4B) suggests that in the absence of FlgP the rod is completed since FlgE is not degraded by the periplasmic proteases, as has been previously reported (49).

FlgT is another flagellar protein localized in the periplasm, it is required to form the H ring that covers the P and L rings. In *R. sphaeroides* the absence of FlgT did not affect flagellar biogenesis (37). To determine whether FlgT is present in the flagellum in the absence of FlgP, we took advantage of the fact that the flagellar protein MotF (present exclusively in *R. sphaeroides*) requires the presence of FlgT to be localized (50). Therefore, we determined if green fluorescent protein (GFP)-MotF is localized in the absence of FlgP. We used strain SF3 ($\Delta flgT$) carrying the plasmids pINDd_flgT and pRK_GFP-MotF as a positive control for this experiment. We observed the presence of fluorescent foci in these cells, suggesting that GFP-MotF is localized in the flagellar structure (Fig. 5A). However, no fluorescent foci were detected in $\Delta flgP$ cells carrying pINDd_flgT and pRK_GFP-MotF, suggesting that in the absence of FlgP the H ring could be destabilized or severely affected. The presence of FlgT and GFP-MotF in total cell extracts of these strains was detected by immunoblotting (Fig. 5B).

FlgP is an integral protein of the basal body and is stable in different genetic backgrounds. We isolated filament basal body structures of WS8N cells and used this preparation for electron microscopy (EM) and for immunodetection of FlgP. An example of the EM images obtained from intact flagellar structures, shows the H ring covering the L and P rings, as previously reported (37) (Fig. 6A). In this same sample, we were able to detect FlgP by immunoblotting, indicating that this protein is a part of this structure (Fig. 6B).

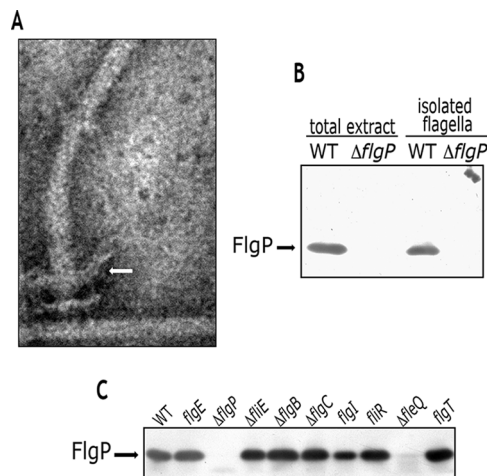


FIG 6 Presence of FlgP in isolated filament basal body preparations and stability of FlgP in the absence of other flagellar components. (A) Sample of an isolated flagellum from the wild-type strain. The arrow denotes the H ring. (B) Immunoblotting of total cell extracts using anti-FlgP antibodies (left lanes) and isolated flagella (right lanes). (C) Stability of FlgP in different genetic backgrounds. Western blots of total cell extracts were probed with anti-FlgP antibodies. WT, wild-type strain WS8N.

In *C. jejuni* FlgP was generally absent or present at low levels in whole-cell lysates of proximal rod (*flgB* and *flgC*) and type III export apparatus (*flip* and *flhA*) mutants (7), indicating that FlgP stability was dependent on other flagellar components. In contrast, we detected FlgP in rod (*flgB* and *flgC*) and type III export apparatus (*fliE* and *fliR*) mutants (Fig. 6C), demonstrating that in *R. sphaeroides* this protein is not particularly unstable.

FlgP interacts with FlgT and FlgH. Given that FlgP is part of the flagellar basal body structure, we evaluated possible interactions of FlgP with other periplasmic flagellar proteins, such as FlgH, FlgT, and MotF. The interactions of the periplasmic region of FlgP with the periplasmic regions of FlgH, FlgT, and MotF were tested using a yeast two hybrid assay. In this assay, we observed that FlgP interacts with FlgH and FlgT (Fig. 7). The possible interaction between FlgP with MotF could not be evaluated given the autoactivation of these proteins (Fig. 7). It should be noted that Gal4BD-FlgP by itself allows growth in the absence of histidine; therefore, only strong interactions that alleviate adenine auxotrophy were considered positives (Fig. 7). In this assay, the interaction of FlgP with FlgP does not occur, since a yeast strain expressing AD-FlgP and BD-FlgP recovered the prototrophy only for histidine (data not shown). Interestingly, FlgH showed a positive interaction with FlgT (Fig. 7).

The interaction of FlgP with FlgP was evaluated by blue native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Two different species of FlgP were detected: one with an apparent molecular mass around 36 kDa that may represent the monomeric form and another that was around 56 kDa (Fig. 8A), suggesting that under these conditions FlgP could form a dimer. In these experiments, we also detected the monomeric and dimeric forms of FlgT (54 and 113 kDa, respectively). When FlgP and FlgT were mixed together, a weak but conspicuous band of around 90 kDa appeared, which was interpreted to represent the oligomeric complex formed by the association of FlgP with FlgT. Since high-molecular-weight markers were used in this native electrophoresis, the apparent molecular masses of the complexes may be overestimated. Denaturing two-dimensional SDS-PAGE (lanes 2 to 4) show that the bands observed in the native gels belong exclusively to FlgP, to FlgT, or to the FlgP/FlgT mixture (Fig. 8B).

The interaction of FlgP with FlgT was also detected by pulldown using glutathione *S*-transferase (GST)-FlgP as a bait (Fig. 9A). In contrast, the interaction between FlgP and FlgH could not be detected using this assay, given that FlgH showed nonspecific interactions with GST (data not shown). Nonetheless, we were able to corroborate the

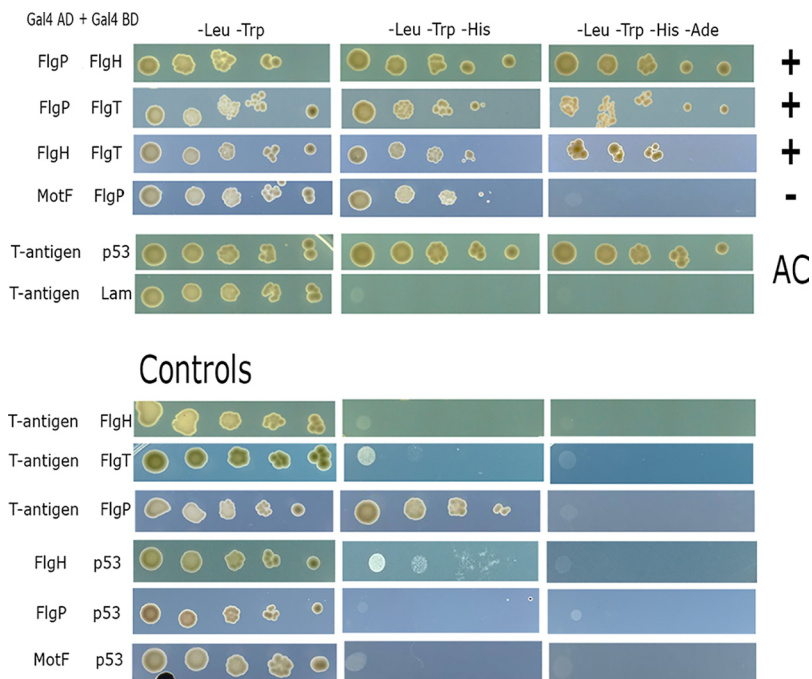


FIG 7 Double hybrid assay. Yeast were transformed with the plasmids indicated at the left. The pairs Gal4AD T-antigen with Gal4 p53, and Gal4AD T-antigen with Gal4 BD Lam served as positive and negative controls, respectively (labeled “AC” [assay controls]). Transformant cells were seeded on the medium indicated at the top. To rule out spurious activation of the reporter genes, yeast cells transformed with a control plasmid, either Gal4 AD T-antigen or Gal4 BD p53, and a flagellar gene in the BD or AD plasmid. The growth of these cells was tested and corresponds to the six combinations in the lower part of the figure (Controls).

interaction between FlgP and FlgH by far-Western analysis (Fig. 9B). For this experiment, GST-FlgP was incubated with the blotted proteins His₆-FlgH and His₆-GFP. The presence of complexes was tested using anti-FlgP antibodies (Fig. 9B). The blotted proteins were also incubated with GST, and the absence of unspecific complexes was confirmed using anti-GST (Sigma) antibodies (Fig. S2).

DISCUSSION

Several new ancillary proteins different from the well-characterized flagellar components of *E. coli* and *Salmonella* have been identified in various bacterial species. These new elements in some cases improve flagellar rotation by recruiting a larger number of stator complexes (7); in others, they contribute to remodel other bacterial structures such as the outer membrane (OM) (51). FlgP is absent in *E. coli* and *Salmonella* but is present in several species of *Vibrio* and many *Epsilonproteobacteria* (29, 30, 52). ECT images suggest that FlgP could form a basal disk located underneath the OM. It has also been suggested that the basal disk (FlgP) attaches to the motor via the P ring (FlgI) in *C. jejuni* and in *V. fischeri* through the H ring (FlgT) (7).

In *R. sphaeroides*, the absence of FlgP causes a Fla⁻ phenotype that contrasts with the phenotypes observed in other species so far studied. In *C. jejuni*, a $\Delta flgP$ mutant forms flagella (30), whereas a reduction in the number of flagellated cells was observed for the $\Delta flgP$ mutant in *V. cholerae* (29). This suggests that in *R. sphaeroides* the role of this protein is not redundant; perhaps the absence of flagellar rings, such as the T ring (present in *Vibrio*) or the proximal and medial disks (found in *C. jejuni*), makes flagellar assembly impossible in the absence of FlgP.

A closer inspection of the $\Delta flgP$ strain of *R. sphaeroides* revealed that the flagellar hook is not assembled even though the presence of the hook protein FlgE was detected by Western blotting. In addition, the fact that flagellin (Flc) and the chemotactic protein CheY4 were not detected in total cell extracts of the $\Delta flgP$ mutant

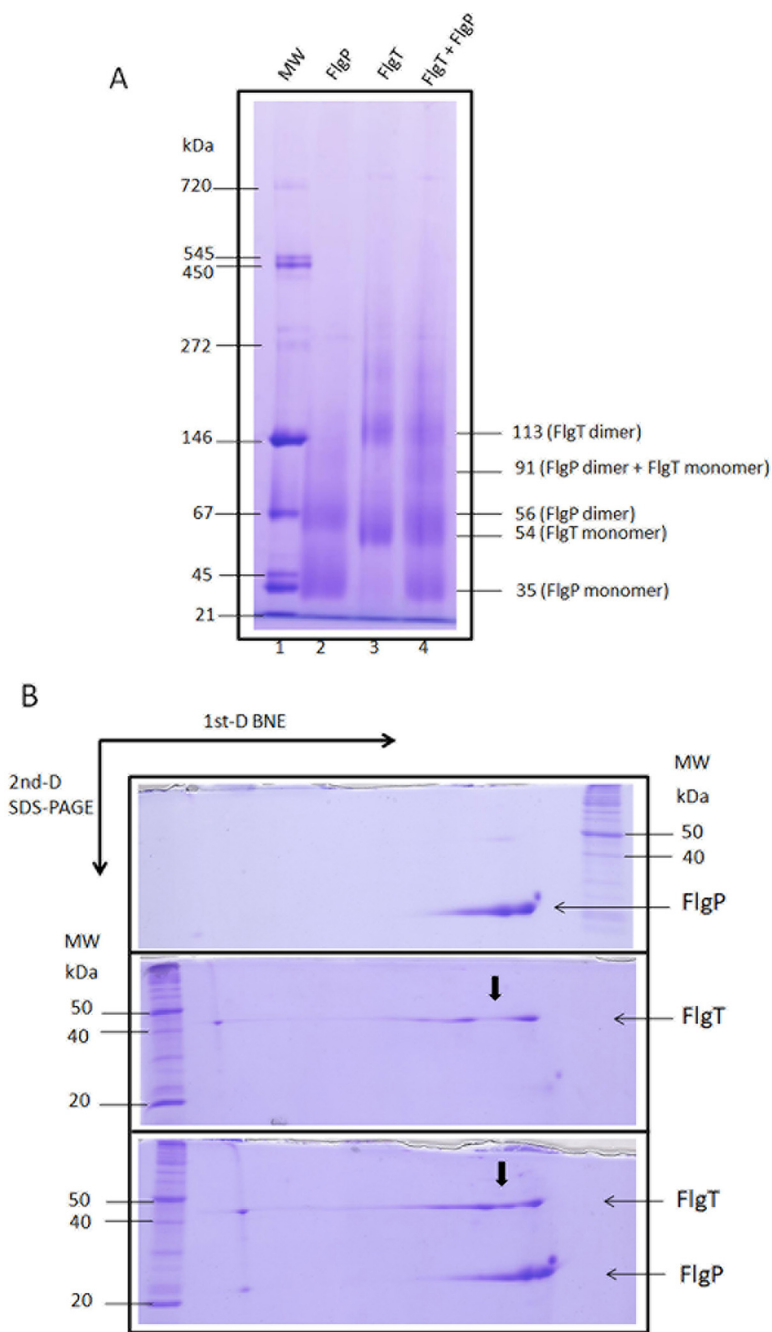


FIG 8 Blue native gel electrophoresis. (A) Portions (100 μ g) of His₆-FlgPp (lane 2), FlgTp-His₆ (lane 3), or a mixture of both proteins (lane 4) were dialyzed overnight in PBS (pH 7.4), mixed with sample buffer, and loaded into a native 4 to 12% acrylamide gradient gel. Lane 1 was loaded with molecular weight protein markers. Gel casting and electrophoresis were performed as described previously (44). (B) Parallel lanes of each sample of interest from panel A were cut and subjected to denaturing two-dimensional SDS-PAGE (14%). The presence of FlgT in the complex formed with FlgP is indicated by an arrow.

indicates that the anti-sigma factor FlgM is not exported. This is consistent with the well-established idea that a structural defect in the hook basal body (HBB) impairs secretion of FlgM (45–47). Nevertheless, in the absence of FlgP, the flagellar rod is assembled, and FlgE was not detected in the culture supernatant. Therefore, the absence of FlgP could be altering the rod to filament transition. This idea is in accordance with the images observed by ECT for the *flgP* mutant of *V. fischeri*, where the rod and the P, L, H, and T rings are formed, but the presence of the hook is not evident (7).

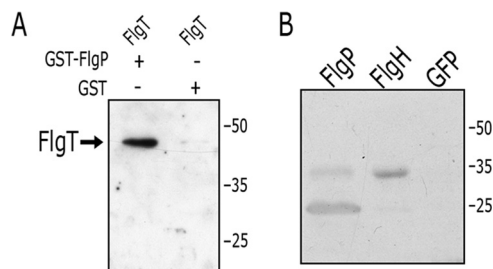


FIG 9 FlgP interaction with FlgT and FlgH. (A) Pull-down assay using glutathione-agarose beads containing either GST-FlgP or GST, followed by incubation with FlgT. After a washing step, the presence of FlgT retained by the tested proteins was revealed by Western blotting. (B) Interaction between FlgP and FlgH tested by far-Western analysis. Purified His₆^x-FlgP, His₆^x-FlgH, and His₆^x-GFP were subject to 12% SDS-PAGE and blotted on nitrocellulose. The membrane was incubated with GST-FlgP for 2 h. After a washing step, the presence of FlgP was detected using anti-FlgP antibodies.

As a result of the absence of FlgT (H ring) in *R. sphaeroides*, MotF is not localized in the flagellar motor (37). Furthermore, we have observed in the present study that in the absence of FlgP, MotF is not recruited to the flagellum, suggesting that the H ring is not formed or that the architecture of the H ring is modified. In agreement with the possible remodeling of these rings as they are being assembled, it was observed in *V. fischeri* that in the absence of FlgP, all the rings were formed (i.e., P, L, T, and H rings), but the stator complexes were not recruited, suggesting that FlgP could modify the architecture of the H and T rings (7).

It is conceivable that the flagellar structure of *R. sphaeroides* has a basal ring similar to that observed in *C. jejuni* and *V. fischeri*. In this regard, our results indicate that FlgP can interact with itself, suggesting that it could be a part of an oligomeric structure, such as the basal disk. Besides this interaction, FlgP also interacts with FlgT, indicating that the OM is in close contact with the H ring through FlgP. In spite of the strong interaction between FlgP and FlgT, recruitment of FlgP to the growing structure should not be dependent only on FlgT, given that the flagellum is formed in its absence (37) but not in the absence of FlgP. This indicates that even in the absence of FlgT, FlgP must be recruited to the growing flagellum. This recruitment could be achieved by a FlgP-FlgH interaction. This is in contrast to the observed situation in *V. fischeri*, where it was proposed that the H ring provides a platform for assembly of FlgP (7).

We observed that FlgP is stable in the different flagellar mutants tested. In contrast, in *C. jejuni*, FlgP was not detected in total cell extracts of proximal rod and type III export apparatus mutants (7). This difference could be explained by a different intrinsic stability of these proteins or by the presence of ancillary flagellar proteins, such as FlgQ and FlgO (52), that are absent in *R. sphaeroides*. FlgQ is required for FlgP stability in *C. jejuni* (30), whereas FlgO of *Vibrio* seems to be a part of the H ring and is located at the OM similar to FlgP (29).

To explain the Fla⁻ phenotype of the Δ *flgP* strain, we propose that the L ring could be remodeled by the basal disk. This event could be part of the check point that involves the removal of the rod scaffolding protein FlgJ to enable hook assembly. It is possible that in other species in which the flagellar hook can be assembled in the absence of FlgP, other proteins collaborate to form an L ring suitable for the removal of FlgJ or that FlgH could accomplish this task by itself, as occurs in *E. coli* and *Salmonella*. A model summarizing the findings reported in this is presented in Fig. 10.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, growth conditions, and oligonucleotides. All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *R. sphaeroides* was grown in Sistrom's minimal medium at 30°C (53). Cultures were grown heterotrophically in Erlenmeyer flasks with orbital shaking (200 rpm). *E. coli* was grown in Luria broth at 37°C (54). When needed, the following antibiotics were used at the indicated concentrations: 25 μ g/ml kanamycin, 50 μ g/ml spectinomycin, and 1 μ g/ml tetracycline. For *E. coli*, the antibiotics used were 100 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml kanamycin, 50 μ g/ml spectinomycin, 30 μ g/ml gentamicin, 25 μ g/ml chloramphenicol, and 10 μ g/ml tetracycline. The oligonucleotides used are also listed in Table 1.

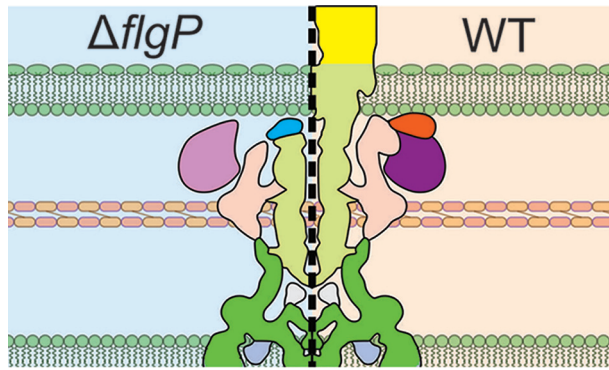


FIG 10 Model showing the possible role of FlgP during flagellar biogenesis in *R. sphaeroides*. The right side depicts the wild-type flagellum where FlgP (orange) interacts with FlgH (pink) and FlgT (violet). The hook (yellow) is formed. The left side shows that, in the absence of FlgP, the hook is not assembled. A possible perturbation in the formation of the L ring (formed by FlgH) prevents the progression of the flagellar biogenesis beyond the outer membrane. In the absence of FlgP, the possible presence of FlgJ (blue) at the tip of the growing flagellum is shown. In addition, FlgT is shown in light violet, indicating that it may also be absent.

Molecular biology techniques. Standard methods were used to isolate and analyze chromosomal or plasmid DNA (54). Restriction and other DNA-modifying enzymes were purchased either from New England BioLabs (NEB, Ipswich, MA), Roche (Basel, Switzerland), or Invitrogen (Carlsbad, CA). Plasmids used for sequencing were purified using an Illustra plasmidPrep minispin kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). DNA was amplified with the appropriate oligonucleotides using PrimeSTAR HS DNA polymerase (TaKaRa Bio, Inc., Mountain View, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Isolation of mutant strains. The CP1 strain ($\Delta flgP::aadA$) was obtained by cloning together two PCR products that amplified the upstream and downstream regions of *flgP* in pTZ19R. The 756-bp product from the upstream region of *flgP* was obtained using the oligonucleotides orf_11 and RvRSP0035B, whereas the downstream product of 1,293 bp was obtained with the oligonucleotides FwRSP0035B and orf_12. These PCR products were joined through a BglII site designed in the oligonucleotides and cloned in pTZ19R. A 1.4-kb PCR fragment carrying the *aadA* gene, which encodes the streptomycin/spectinomycin adenyltransferase (Spc^r) (44), was cloned into pTZ_ΔflgPup-down previously digested with BglII. The resultant plasmid, pTZ_ΔflgP::aadA, was digested with XbaI, and the fragment carrying the allele $\Delta flgP::aadA$ was subcloned in plasmid pQJ200mp18. To obtain the CP2 strain ($\Delta flgH::aadA$), a similar strategy to that used to obtain CP1 was followed; in this case, the 700-bp product from the upstream region of *flgH* was obtained using the oligonucleotides Fw_flgH and Rv_flgH, whereas a downstream product of 1,008 bp was obtained with Fwi_flgH and Rv_flgH. These products were joined through a BamHI site designed in the oligonucleotides and cloned in pTZ19R_BamHI-. The fragment carrying the *aadA* gene was cloned in pTZ_flgHup-down previously digested with BamHI. The fragment carrying $\Delta flgH::aadA$ was subcloned in pQJ200mp18.

Plasmid constructions. pRK415_flgP plasmid carries a 1,086-bp fragment that includes the coding region of *flgP* (534 bp), 501 bp upstream and 51 bp downstream. pRK_flgPT carries a 2,300-bp fragment that includes the coding regions of *flgP* and *flgT* (1,083 bp), 501 bp upstream of *flgP* and 186 bp downstream of the stop codon of *flgT*. pINdd_flgT was obtained by cloning the 1,083-bp PCR product encoding the complete polypeptide of FlgT in pINdd.

Protein purification. The coding region of *flgP* lacking the segment corresponding to the signal peptide was amplified by PCR using the oligonucleotides 0035fwBAD and 0035RvBAD and cloned in pBAD-HisB. The resultant plasmid was introduced to the strain LMG194 strain. A culture of this strain was grown until midexponential phase and induced with 0.2% arabinose for 6 h at 28°C. The culture was harvested and resuspended in buffer containing 50 mM Tris, 5% glycerol, 50 mM NaCl, and 1 mg/ml lysozyme (pH 8). The cell suspension was sonicated on ice with three bursts of 10 s. Cell debris were removed by centrifugation. The supernatant was mixed with nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)-agarose beads (1/250 of the original culture volume) and incubated by 1 h on ice, with occasional mixing. The beads were washed with 3 volumes of phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). The protein was eluted in PBS containing 20% glycerol and 200 mM imidazole. The purity of the His₆-FlgPp (periplasmic region of FlgP) was evaluated by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The sample was dialyzed overnight using PBS (pH 7.4). To purify FlgH, the fragment encoding from Ala58 to the stop codon of *flgH* (FlgHp) was amplified by PCR using the oligonucleotides flgH-pGABfw and flgH-pBADB and cloned in pET28a. The purification protocol was similar to the procedure used to purify His₆-FlgPp, except that induction of the cell culture was carried out with 0.25 mM IPTG for 4 h at 28°C. FlgTp-His₆ and His₆-MotFp were purified using the procedures previously described (37, 50). The plasmid expressing glutathione S-transferase fused to the mature polypeptide of FlgP (GST-FlgPp) was constructed by cloning in pGEX-4T-2, the PCR product obtained with the oligonucleotides 0035FwpGEX and 0035RvpGEX that encompasses the coding region of *flgP*, excluding the segment that encodes the signal peptide

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study^a

Strain, plasmid, or source oligonucleotide	Relevant characteristics or sequence	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
LMG194	<i>ΔlacX74 galE thi rpsL ΔphoA Δara714 leu::Tn10</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP4-2 Tc::Mu::Tn7</i>	58
TOP10	Cloning strain	Invitrogen
Rosetta	Protein expression strain; Cm ^r	Novagen
Yeast AH109	Yeast reporter strain for HIS3, ADE2, and <i>lacZ</i>	Clontech
<i>R. sphaeroides</i>		
CP1	<i>ΔflgP::aadA</i>	This study
CP2	<i>ΔflgH::aadA</i>	This study
LC1	<i>flgE::aadA</i>	44
Rsgl-np	<i>flgI::aadA</i>	59
SF3	<i>flgT::aadA</i>	37
SP2	<i>fliR::uidA-aadA</i>	60
SP13	<i>ΔfleQ::aadA</i>	43
SP30	<i>ΔfliE::aadA</i>	Laboratory collection
SP31	<i>ΔflgC::aadA</i>	Laboratory collection
SP32	<i>ΔflgB::aadA</i>	Laboratory collection
SP33	<i>ΔfliO::aadA</i>	Laboratory collection
WS8N	Wild-type strain	61
Plasmids		
pBAD His-motFp	Vector expressing His _{6×} -MotFp	50
pBAD_FlgPp	Vector expressing His _{6×} -FlgPp	This study
pBAD/HisB	Expression vector of His _{6×} -tagged proteins	Invitrogen
pBAD/Myc-HisA-flgT	Vector expressing FlgT-His _{6×}	37
pET28_FlgHp	Vector expressing His _{6×} -FlgHp	This study
pET28a	Expression vector His _{6×} -tagged proteins	Novagen
pGAD_flgH	pGAD derivative expressing GAL4 AD-FlgHp	This study
pGAD_flgP	pGAD derivative expressing GAL4 AD-FlgPp	This study
pGAD_motFp	pGAD derivative expressing GAL4 AD-MotFp	37
pGADT7	GAL4 activation domain, LEU2	Clontech
pGBD_flgH	pGAD derivative expressing GAL4 BD-FlgHp	This study
pGBD_flgP	pGAD derivative expressing GAL4 BD-FlgPp	This study
pGBD_flgT	pGAD derivative expressing GAL4 BD-FlgTp	37
pGBKT7	GAL4 DNA binding domain, TRP1	Clontech
pGEX-4T-2	Expression vector for GST fusions	Amersham
pGEX-4T-2_flgP	Plasmid expressing the fusion GST-FlgPp	This study
pIND4	IPTG-inducible expression vector for <i>R. sphaeroides</i>	62
pINDd	pIND4 <i>ΔlacI</i>	This study
pINDd_flgT	pINDd expressing <i>flgT</i>	This study
pJQ_flgH::aadA	pJQ carrying <i>ΔflgH::aadA</i>	This study
pJQ_ΔflgP::aadA	pJQ carrying <i>ΔflgP::aadA</i>	This study
pJQ200mp18	Mobilizable suicide vector for <i>R. sphaeroides</i>	63
pRK_flgH	pRK415 expressing <i>flgH</i>	This study
pRK_flgP	pRK415 expressing <i>flgP</i>	This study
pRK_flgPT	pRK415 expressing <i>flgPT</i>	This study
pRK_flgT	pRK415 expressing <i>flgT</i>	37
pRK_GFP-Flif	pRK expressing GFP-Flif	Laboratory collection
pRK_GFP-MotF	pRK415 expressing the GFP-MotF fusion	50
pRK415	Vector used for expression in <i>R. sphaeroides</i>	64
pTZ_ΔflgP::aadA	pTZ carrying <i>ΔflgP::aadA</i>	This study
pTZ_ΔflgPup-down	pTZ carrying <i>flgPupdown</i>	This study
pTZ19R	Cloning vector	Thermo Fisher Scientific
pTZ19R_Bam-	pTZ19R without BamHI site	Laboratory collection
pTZBam_flgH::aadA	pTZ carrying <i>ΔflgH::aadA</i>	This study
pTZBam_flgHup-down	pTZ carrying <i>flgHupdown</i>	This study
Oligonucleotides		
orf_11	GCTCTAGACCTTGCCCGCCGATCGTG	
RvRSP0035B	GCAGATCTGCCCGGCTGGCCCGCAGCG	
FwRSP0035B	GCAGATCTTATCGTCAAGGCGGCACGGCTG	
orf_12	GCTCTAGACGTTACGCGCTCCACATGG	
Fw_flgH	GCTCTAGAGGTGCTGATGCCCGACGG	
Rvi_flgH	GCGGATCCACGATGTCGCCACCCGC	
Fwi_flgH	GCGGATCCGCTCGACGACGGGTGCT	

(Continued on next page)

Downloaded from <http://j.b.asm.org/> on August 29, 2019 by guest

TABLE 1 (Continued)

Strain, plasmid, or source oligonucleotide	Relevant characteristics or sequence	Reference or source
Rv_flgH	CGGAATTCGCGCACGCGGATCGAGGT	
0035fwBAD	GCAGATCTGCGCCGGGGCCGCGCGGGT	
0035RvBAD	GCGAATTCGAAGCCGTTTCACCGCAGCCG	
flgH-pGABfw	GCGAATTCGACCTATGTCGAGGACCCG	
flgH-pGABrv	GCGGATCCGAAGCGCTGCGAGAAGGAGAG	
0035fw pGA-pGB	GCCCATGGCGCCGGGGCCGCGCGGGT	
0035rvBAD	GCGAATTCGAAGCCGTTTCACCGCAGCCG	
flgH-pBADB	GCAAGCTTGAAGCGCTGCGAGAAGGAGAG	
0035FwpGEX	GCGAATTCGCGCCGGGGCCGCGCGGGT	
0035RvpGEX	GCGTGCAGCAAGCCGTTTCACCGCAGCCG	

^cCm^r, chloramphenicol resistance.

sequence. The resultant plasmid was used to transform the *E. coli* strain Rosetta. The resultant cells were grown in Luria broth medium (30 ml) supplemented with chloramphenicol and ampicillin at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6. The culture was induced by the addition of IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) to a final concentration of 0.25 mM, cultured for 4 h at 30°C, and collected by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS containing 20% glycerol (pH 7.4) and 1 mg/ml lysozyme. The cell suspension was let stand on ice for 1 h before sonication with three bursts of 9 s. Cell debris was removed by centrifugation. The supernatant was mixed with 100 μl of glutathione-agarose beads and incubated for 1 h on ice, mixing by inversion every 10 min. The beads were washed with 3 volumes of PBS. GST-FlgPp protein was eluted in elution buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM reduced glutathione [pH 8]). GST was purified according to a similar protocol.

Immunoblotting and antibody production. Samples were obtained from heterotrophically grown cultures at an OD₆₀₀ of 0.6. At this point, the cells were harvested and lysed by boiling in a solution containing 2% SDS, 1% β-mercaptoethanol, and 50 mM Tris (pH 7.5). Western blotting was performed as previously described (55). Briefly, these samples were separated using 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 2% fat-free milk in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, containing 0.1% Tween 20 [pH 7.4]) for 12 h. After a wash in TBST, the membranes were incubated with the primary antibody in the same buffer, as indicated. Removal of excess primary antibody was carried out by washing the membrane three times in TBST. The secondary antibody (phosphatase alkaline-conjugated, anti-mouse IgG secondary antibody) diluted 1:30,000 was incubated with the membrane in TBST for 1 h. After being washed, the membranes were incubated with CDP-Star (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) reagent for detection on X-ray films. Polyclonal antibodies were raised in female BALB/c mice against His_{6x}-FlgPp and His_{6x}-FlgHp according to previously reported protocols (55).

Microscopy. Slides were covered with an agarose pad containing Siström's culture medium. Images were taken with a Hamamatsu Orca-ER camera and a Nikon E600 microscope. The flagellum was stained DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) according to a previous report (50). Immunofluorescent detection of FlgE was carried out by fixing cells from a heterotrophically grown culture, where cells were swimming (OD₆₀₀ ~0.6) with paraformaldehyde (3%); after 20 min at room temperature, the paraformaldehyde was removed by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 1/10 of the original volume in PBS–1% bovine serum albumin (BSA). Anti-FlgE γ-globulins were stained with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Yeast two-hybrid assays. The assays were performed according to the directions of the manufacturer (Clontech). In summary, yeast cells of the strain AH109 were cotransformed with pGBKT7 and pGADT7 plasmids expressing the mature polypeptide of FlgP, or FlgH, fused to the activation (AD) or DNA binding (BD) domain of Gal4. The DNA fragment encoding the periplasmic regions of FlgP and FlgH was obtained by PCR using the oligonucleotides 0035fw pGA-pGB and 0035rvBAD or the oligonucleotides flgH-pGABfw and flgH-pBADB, respectively. The plasmid expressing pGBD-flgT was previously reported (37). pGBKT7 and pGADT7 plasmids restore prototrophy for leucine (LEU) and tryptophan (TRP), respectively. For interaction assays, the AH109 strain carrying the appropriated plasmids was grown overnight in synthetic defined (SD) minimal medium supplemented with histidine (HIS) and adenine (ADE), washed in SD medium without HIS and ADE, diluted at OD₆₀₀ of 0.5, and serially diluted in the same medium. From these dilutions, 10-μl aliquots were seeded on plates containing SD supplemented with HIS and ADE (–LEU –TRP), ADE (–LEU –TRP –HIS), or HIS (–LEU –TRP –ADE).

Blue native PAGE. A total of 100 μg of His_{6x}-FlgPp, FlgTp-His_{6x}, or a mixture of both proteins was dialyzed overnight in PBS (pH 7.4), mixed with sample buffer, and loaded in a native 4 to 12% acrylamide gradient gel. Gel casting and electrophoresis were performed as described before (56). The lines of each sample were cut and subjected to denaturing two-dimensional SDS-PAGE (14%).

Pulldown interaction assay. Next, 5 μg of GST-FlgPp or GST bound to glutathione-agarose beads in PBS (pH 7.4) was mixed with FlgT-His_{6x} in a 1:1 molar ratio. The volume was adjusted to 250 μl with PBS containing 10% glycerol and 3% BSA. The mixture was incubated for 2 h at 4°C, with mixing by inversion every 10 min. The beads were collected by centrifugation for 1 min at 3,000 rpm. The supernatant was discarded, and the beads were washed three times with 1 ml of PBS. To elute the protein, the beads were resuspended in 100 μl of buffer containing 100 mM Tris (pH 8) and 10 mM reduced L-glutathione. After 10 min, the sample was centrifuged for 1 min at 5,000 rpm. An aliquot (10 μl) of the supernatant was analyzed by Western blotting with Penta-His antibodies (Qiagen).

Far-Western assay. Far-Western blotting was performed according to a method reported previously (57). Briefly, 5 μ g of His₆-FlgP and His₆-GFP protein was mixed with an equal volume of 2 \times Laemml sample buffer without β -mercaptoethanol, loaded onto 12% acrylamide (wt/vol), and electrophoresed at 100 V. Proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes as described previously (55). Membranes were incubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk in PBS [pH 7.4] and 0.05% Tween 20) for 1 h with shaking. Blocked membranes were incubated with 17 μ g of purified GST-FlgP or GST proteins in 10 ml of blocking buffer for 1 h with shaking. Membranes were washed three times for 5 min in PBS (pH 7.4) and 0.05% Tween 20, followed by incubation with anti-FlgP or anti-GFP antibodies diluted 1:5,000, for 1 h, and then washed again three times for 10 min in PBS–0.05% Tween 20, followed by incubation with anti-mouse AP antibody (Sigma, 1:30,000) for 45 min. Antibody binding was detected by incubation with CDP-Star reagent according to the manufacturer's instructions and visualized by autoradiography.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00752-18>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Aurora Osorio, Javier de la Mora, Teresa Ballado, Jorge Omar García Rebollar, and Miriam Vázquez for technical assistance. We thank the Molecular Biology Unit at IFC-UNAM for sequencing facilities.

C.P.-G. was supported by a fellowship from CONACyT (2013 to 2018). This study was partially supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN204317) and CONACyT (CB2014-235996).

REFERENCES

- Berg HC. 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72:19–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>.
- Terashima H, Kojima S, Homma M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* 270: 39–85. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01402-0](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01402-0).
- Khan S, Dapice M, Reese TS. 1988. Effects of *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor. *J Mol Biol* 202:575–584. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90287-2).
- Murphy GE, Leadbetter JR, Jensen GJ. 2006. *In situ* structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. *Nature* 442:1062–1064. <https://doi.org/10.1038/nature05015>.
- Chen S, Beeby M, Murphy GE, Leadbetter JR, Hendrixson DR, Briegel A, Li Z, Shi J, Tocheva EI, Muller A, Dobro MJ, Jensen GJ. 2011. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J* 30:2972–2981. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.186>.
- Liu J, Lin T, Botkin DJ, McCrum E, Winkler H, Norris SJ. 2009. Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *J Bacteriol* 191:5026–5036. <https://doi.org/10.1128/JB.00340-09>.
- Beeby M, Ribardo DA, Brennan CA, Ruby EG, Jensen GJ, Hendrixson DR. 2016. Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stator rings using a conserved protein scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E1917–E1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518952113>.
- Sowa Y, Berry RM. 2008. Bacterial flagellar motor. *Q Rev Biophys* 41: 103–132. <https://doi.org/10.1017/S0033583508004691>.
- Asai Y, Kojima S, Kato H, Nishioka N, Kawagishi I, Homma M. 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol* 179:5104–5110. <https://doi.org/10.1128/jb.179.16.5104-5110.1997>.
- Blair DF, Berg HC. 1990. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60:439–449. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90595-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90595-6).
- Ueno T, Oosawa K, Aizawa S. 1992. M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* 227:672–677. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90216-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90216-7).
- Jones CJ, Macnab RM, Okino H, Aizawa S. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 212:377–387. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90132-6).
- Irikura VM, Kihara M, Yamaguchi S, Sockett H, Macnab RM. 1993. *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J Bacteriol* 175:802–810. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.802-810.1993>.
- Sockett H, Yamaguchi S, Kihara M, Irikura VM, Macnab RM. 1992. Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 174:793–806. <https://doi.org/10.1128/jb.174.3.793-806.1992>.
- Sircar R, Borbat PP, Lynch MJ, Bhatnagar J, Beyersdorf MS, Halkides CJ, Freed JH, Crane BR. 2015. Assembly states of FliM and FliG within the flagellar switch complex. *J Mol Biol* 427:867–886. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.12.009>.
- Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM. 2000. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol* 182:3029–3036. <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3029-3036.2000>.
- Muller V, Jones CJ, Kawagishi I, Aizawa S, Macnab RM. 1992. Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J Bacteriol* 174:2298–2304. <https://doi.org/10.1128/jb.174.7.2298-2304.1992>.
- Kubori T, Shimamoto N, Yamaguchi S, Namba K, Aizawa S. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 226:433–446. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90958-M](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90958-M).
- Homma M, Kutsukake K, Hasebe M, Iino T, Macnab RM. 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 211:465–477. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90365-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90365-5).
- DePamphilis ML, Adler J. 1971. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 105:384–395.
- Jones CJ, Macnab RM. 1990. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *J Bacteriol* 172:1327–1339. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1327-1339.1990>.
- Jones CJ, Homma M, Macnab RM. 1989. L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* 171:3890–3900. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.3890-3900.1989>.
- Cohen EJ, Hughes KT. 2014. Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. *J Bacteriol* 196:2387–2395. <https://doi.org/10.1128/JB.01580-14>.

24. Wagenknecht T, DeRosier DJ, Aizawa S, Macnab RM. 1982. Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. *J Mol Biol* 162:69–87. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90162-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90162-0).
25. Matsunami H, Barker CS, Yoon YH, Wolf M, Samatey FA. 2016. Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions. *Nat Commun* 7:13425. <https://doi.org/10.1038/ncomms13425>.
26. Zhao X, Norris SJ, Liu J. 2014. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry* 53:4323–4333. <https://doi.org/10.1021/bi500059y>.
27. Terashima H, Kawamoto A, Morimoto YV, Imada K, Minamino T. 2017. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophys Physicobiol* 14:191–198. <https://doi.org/10.2142/biophysico.14.0.191>.
28. Minamoto T, Imada K. 2015. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol* 23:267–274. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.011>.
29. Martinez RM, Dharmasena MN, Kirn TJ, Taylor RK. 2009. Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *J Bacteriol* 191:5669–5679. <https://doi.org/10.1128/JB.00632-09>.
30. Sommerlad SM, Hendrixson DR. 2007. Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 189:179–186. <https://doi.org/10.1128/JB.01199-06>.
31. Merino S, Tomas JM. 2016. The FlgT protein is involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagella stability and not affects anchorage of lateral flagella. *Front Microbiol* 7:1150.
32. Morris DC, Peng F, Barker JR, Klose KE. 2008. Lipidation of an FlrC-dependent protein is required for enhanced intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 190:231–239. <https://doi.org/10.1128/JB.00924-07>.
33. Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 189:3208–3216. <https://doi.org/10.1128/JB.01681-06>.
34. Armitage JP, Macnab RM. 1987. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 169:514–518. <https://doi.org/10.1128/jb.169.2.514-518.1987>.
35. de la Mora J, Uchida K, del Campo AM, Camarena L, Aizawa S, Dreyfus G. 2015. Structural Characterization of the Fla2 Flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 197:2859–2866. <https://doi.org/10.1128/JB.00170-15>.
36. Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-López R, Gómez-César E, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2015. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *J Bacteriol* 197:833–847. <https://doi.org/10.1128/JB.02429-14>.
37. Fabela S, Domenzain C, De la Mora J, Osorio A, Ramirez-Cabrera V, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2013. A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and Flil and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 195:5285–5296. <https://doi.org/10.1128/JB.00760-13>.
38. Cameron DE, Urbach JM, Mekalanos JJ. 2008. A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8736–8741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803281105>.
39. Martinez RM, Jude BA, Kirn TJ, Skorupski K, Taylor RK. 2010. Role of FlgT in anchoring the flagellum of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 192:2085–2092. <https://doi.org/10.1128/JB.01562-09>.
40. Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M. 2010. The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. *J Bacteriol* 192:5609–5615. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-10>.
41. Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12:1652–1662. <https://doi.org/10.1110/ps.0303703>.
42. Seydel A, Gounon P, Pugsley AP. 1999. Testing the ‘+2 rule’ for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol Microbiol* 34:810–821. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01647.x>.
43. Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2005. The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* 58:969–983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04900.x>.
44. Ballado T, Camarena L, Gonzalez-Pedrajo B, Silva-Herzog E, Dreyfus G. 2001. The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *J Bacteriol* 183:1680–1687. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1680-1687.2001>.
45. Kutsukake K. 1994. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 243:605–612.
46. Karlinsky JE, Tsui HC, Winkler ME, Hughes KT. 1998. Flk couples *flgM* translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 180:5384–5397.
47. Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsky JE. 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262:1277–1280. <https://doi.org/10.1126/science.8235660>.
48. Hernandez-Valle J, Domenzain C, de la Mora J, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L. 2017. The master regulators of the Fla1 and Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate CheY proteins. *J Bacteriol* 199:e00670-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00670-16>.
49. Bonifield HR, Yamaguchi S, Hughes KT. 2000. The flagellar hook protein, FlgE, of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is posttranscriptionally regulated in response to the stage of flagellar assembly. *J Bacteriol* 182:4044–4050. <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.4044-4050.2000>.
50. Ramirez-Cabrera V, Poggio S, Domenzain C, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2012. A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. *J Bacteriol* 194:6174–6183. <https://doi.org/10.1128/JB.00850-12>.
51. Zhu S, Nishikino T, Hu B, Kojima S, Homma M, Liu J. 2017. Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:10966–10971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712489114>.
52. Chaban B, Coleman I, Beeby M. 2018. Evolution of higher torque in *Campylobacter*-type bacterial flagellar motors. *Sci Rep* 8:97. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18115-1>.
53. Sistrom WR. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 28:607–616. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-4-607>.
54. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley, New York, NY.
55. Harlow E, Lane D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
56. Schagger H, Cramer WA, von Jagow G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217:220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>.
57. Edmondson DG, Roth SY. 2001. Identification of protein interactions by far Western analysis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter20:Unit 20.26.
58. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:37–45.
59. Gonzalez-Pedrajo B, de la Mora J, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G. 2002. Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1579:55–63. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00504-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00504-3).
60. Poggio S, Aguilar C, Osorio A, Gonzalez-Pedrajo B, Dreyfus G, Camarena L. 2000. σ^{54} promoters control expression of genes encoding the hook and basal body complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 182:5787–5792. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5787-5792.2000>.
61. Foster, Jca SRE, Armitage JP. 1990. Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp* 53:473–479.
62. Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, de Beyer JA, Godfrey SA, Armitage JP. 2009. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 75:6613–6615. <https://doi.org/10.1128/AEM.01587-09>.
63. Quandt J, Hynes MF. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15–21.
64. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191–197.