



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la interacción FlgT-MotF en el sistema flagelar 1 de *Rhodobacter sphaeroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. David Rodríguez Méndez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Georges Dreyfus Cortés
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2021



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 académicos

Agradezco el apoyo brindado por mi comité tutorial: Dra. Laura Camarena, Dr. Georges Dreyfus y Dr. Diego González Halphen. Su guía, comentarios y observaciones fueron esenciales para la culminación de este trabajo.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a miembros del laboratorio: empezando con la Dra. Clelia Domenzain, por su apoyo incondicional y su ayuda en diversos experimentos realizados en este trabajo. Al Dr. Sebastián Poggio, por sus críticas y comentarios para mejorar mi desempeño científico. Y a la QFB. Aurora Osorio, por su inmenso apoyo técnico en la preparación de distintos materiales y medios que fueron utilizados en este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Gloria Soberón, Dr. Fernando Suaste, Dr. Rodolfo García, Dr. Pablo Vinuesa y Dr. José Luis Puente. Por sus atinadas observaciones y comentarios para la mejora del trabajo escrito.

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada para realizar mis estudios (CVU: 928860).

El presente trabajo de Tesis de llevó a cabo en el Depto. de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue parcialmente financiado por el PAPIIT IG200420 y el Programa de Producción de Biomoléculas de Interés Biomédica y Biotecnológico en Bacterias y Hongos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Agradecimientos personales

A mis padres Gabriela y Marcos, a mi hermana Erika y a toda mi familia. Gracias por su apoyo nuevamente, sin ustedes nada de lo que he conseguido hubiera sido posible. Sus consejos y su cariño me motivan día con día para continuar haciendo lo que más me gusta.

A mis amigos y compañeros del Rhodo-Caulo Lab: José, Benja, Jimena, Thelma, Caleb, Clelia, Vero, Luis David, Víctor, Mariana, Fernanda, Elidet, y Ale. Gracias por su amistad durante los últimos años, hemos compartido grandes momentos juntos y a pesar de que ahora la distancia nos separa, ustedes siempre serán mi familia.

A diversos amigos: Fer, Trejo, Emilio, Dany, Aranza, Mariana, Alan y Jacinto. Que por más que pasen los años, la amistad perdura y el cariño prevalece.

A la Dra. Laura Camarena, gracias nuevamente por darme la confianza y la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por enseñarme mucho de lo que sé y por apoyarme siempre en todos mis objetivos académicos y personales. Siempre le estaré agradecido.

Finalmente, quiero agradecer a la Escuela Nacional Preparatoria No.9, a la Facultad de Ciencias, al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México. Que en conjunto, han sido mi hogar por más de once años y me han abierto las puertas del mundo.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Estructura flagelar	3
1.2 Estatores flagelares	5
1.3 Componentes axiales	8
1.4 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	9
1.5 Jerarquía flagelar	11
1.6 MotF	12
1.7 FlgT	16
2. Planteamiento del problema	18
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos particulares	20
5. Materiales y métodos	21
5.1 Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y antibióticos	21
5.2 Medios	26
5.3 Condiciones de cultivo	27
5.4 Obtención de cepas	28
5.5 Construcción de plásmidos	29
5.6 Ensayos de nado	32
5.7 Ensayos de inmunodetección	32
5.8 Evaluación de fluorescencia <i>in vivo</i>	33
5.9 Ensayo de doble-híbrido en levaduras	34
5.10 Ensayo de β -galactosidasa	34
5.11 Ensayo de purificación de peptidoglicano	35
5.12 Análisis bioinformáticos	36
5.13 Análisis filogenéticos	36
6 Resultados	37
6.1 Análisis de la interacción FlgT-MotF	37
6.1.1 Mediante ensayo de doble-híbrido	37
6.1.2 Mediante ensayo de la actividad de β -galactosidasa	39
6.2 Predicción del sitio de unión en FlgT	41
6.3 Mutaciones en la F32 y F315 de FlgT	45
6.4 Mutaciones en la Y238 de MotF	47
6.5 Dinámica de la unión de MotB con el peptidoglicano	51
6.6 Origen filogenético de MotF	53
7. Discusión	63
7.1 Ensayos de interacción mediante doble-híbrido	63
7.2 La F315 es esencial para la estabilidad de FlgT	64
7.3 Relevancia de los tipos de aminoácidos en el residuo 238 de MotF	65
7.4 MotF, FliL y FlgT y su papel en la activación de los estatores	67
7.5 Ortólogos a MotF y su adquisición por transferencia horizontal	69
8. Conclusión	71
9. Perspectivas	71
10. Referencias	72

Resumen

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria con dos conjuntos completos de genes flagelares. Uno de estos conjuntos (Fla1), se expresa constitutivamente en las condiciones de crecimiento comúnmente empleadas en el laboratorio (aerobiosis en medio Sistrom), en las que las células ensamblan un solo flagelo subpolar. Dentro del locus flagelar 1 (Fla1) hay un operón bicistrónico putativo compuesto por RSP_0067 y RSP_6092 que está entre *flhB* y el gen que codifica el factor sigma flagelar, *rpoN2*. La inactivación de RSP_0067 (*motF*) produce un fenotipo Mot- (las células pueden ensamblar un flagelo pero no pueden rotarlo).

motF codifica un polipéptido de 239 aminoácidos. El análisis de la secuencia primaria de MotF predice un segmento transmembranal, localizado entre los residuos 54 y 74. Estudios recientes han demostrado un alto grado de conservación en el extremo C-terminal de MotF, y en este trabajo encontramos que al reemplazar la tirosina 238 por aminoácidos apolares (A y G), con carga negativa (D y E) y polares sin carga (S y T), se elimina completamente la funcionalidad de la proteína al no poder ser localizada en la base del flagelo. Tal incapacidad se puede restaurar reemplazando el residuo 238 con otros residuos aromáticos (F y W), hidrofóbicos (I y L) y de carga positiva (H, R y K).

Estudios pioneros en *Vibrio alginolyticus*, donde se resolvió la estructura cristalográfica de FlgT, la proteína formadora del anillo H, revelaron la presencia de una horquilla β en el extremo C-terminal que se fija al extremo N-terminal por interacciones aromáticas tipo π - π y T-apilamiento. Estas interacciones parecen estar ausentes en FlgT de *R. sphaeroides*, en donde hay residuos aromáticos en la región, pero están espacialmente distantes entre sí como para permitir estas interacciones donde la distancia es fundamental.

En este trabajo, propusimos una interacción novedosa de un trímero aromático entre las fenilalaninas 32 y 315 de FlgT, y la tirosina 238 de MotF. Los resultados presentados indican que la F315 es necesaria para la estabilidad de la proteína FlgT, sin embargo, dichos residuos aromáticos no son necesarios para reclutar a MotF en la base del flagelo.

Experimentos adicionales, demostraron que la proteína de los estatores MotB, es capaz de unirse a la pared de peptidoglicano en ausencia de MotF, FliL y FlgT, siendo así la primera evidencia que indica que los estatores de *R. sphaeroides* son reclutados y anclados a la pared de peptidoglicano, pero no son funcionales. Por lo anterior, proponemos a estas tres proteínas como posibles responsables de la activación de MotB.

Por último, presentamos evidencias que señalan el descubrimiento de ortólogos de *motF* en un grupo diferente de la familia Rhodobacteraceae, concretamente en el género *Limnohabitans*. Por análisis filogenéticos demostramos que los sistemas flagelares 1 presentes en estos dos últimos grupos, son resultado de eventos de transferencia horizontal, y que *motF* fue adquirido en el mismo evento.

Introducción

Uno de los sistemas principales responsable de la motilidad en bacterias, es el flagelo. El flagelo bacteriano, es una estructura filamentososa que permite el movimiento celular en ambientes tanto líquidos como superficies sólidas. Mientras que el sistema quimotáctico percibe señales del medio ambiente y controla la rotación del flagelo, dando como resultado el desplazamiento en dirección de estímulos atractivos o para alejarse de repelentes. (Chevance y Hughes, 2008 y Morimoto y Minamino, 2021).

El flagelo es un complejo proteico supramolecular formado por aproximadamente 30 proteínas diferentes, en donde el número de copias de cada proteína varía de unas cuantas decenas a miles de subunidades. Más de 60 proteínas están involucradas en el ensamblaje, estructura, generación de fuerza motriz y quimiotaxis (Morimoto y Minamino, 2021).

Desde un punto de vista metabólico, la formación de tal complejo demanda de un gran gasto energético. La coordinación en el ensamblaje de las proteínas es crucial, por lo cual existe un mecanismo regulador de genes que gestiona la transcripción de estos (Chevance y Hughes, 2008).

Estructuralmente, el flagelo se puede dividir en cuatro componentes principales: el cuerpo basal (rotor-aparato de exportación), los estatores, el gancho y el filamento. El cuerpo basal se encuentra embebido en las membranas celulares y funciona como un motor rotatorio impulsado por un gradiente electroquímico generado por los estatores a través de la membrana citoplasmática. El gancho y el filamento están ubicados en la parte extracelular, en donde el gancho sirve como junta entre el cuerpo basal y el filamento que actúa como una propela (Camarena y Dreyfus, 2020 y Morimoto y Minamino, 2021).

Estructura flagelar

El cuerpo basal flagelar contiene el rotor y el aparato de exportación, y está compuesto por numerosas proteínas arregladas en anillos alrededor en un eje central. El rotor es la parte giratoria del flagelo constituido por una serie de anillos que son nombrados por su posición con respecto a la envoltura celular (Figura 1). El “anillo C” se encuentra en el citoplasma y está formado por subunidades de las proteínas FliG, FliM y FliN (Sockett *et al.*, 1992; Irikura *et al.*, 1993 y Sircar *et al.*, 2015). Mientras que el “anillo MS” es un anillo hueco en la membrana interna conformado únicamente por la proteína FliF (Ueno *et al.*, 1992).

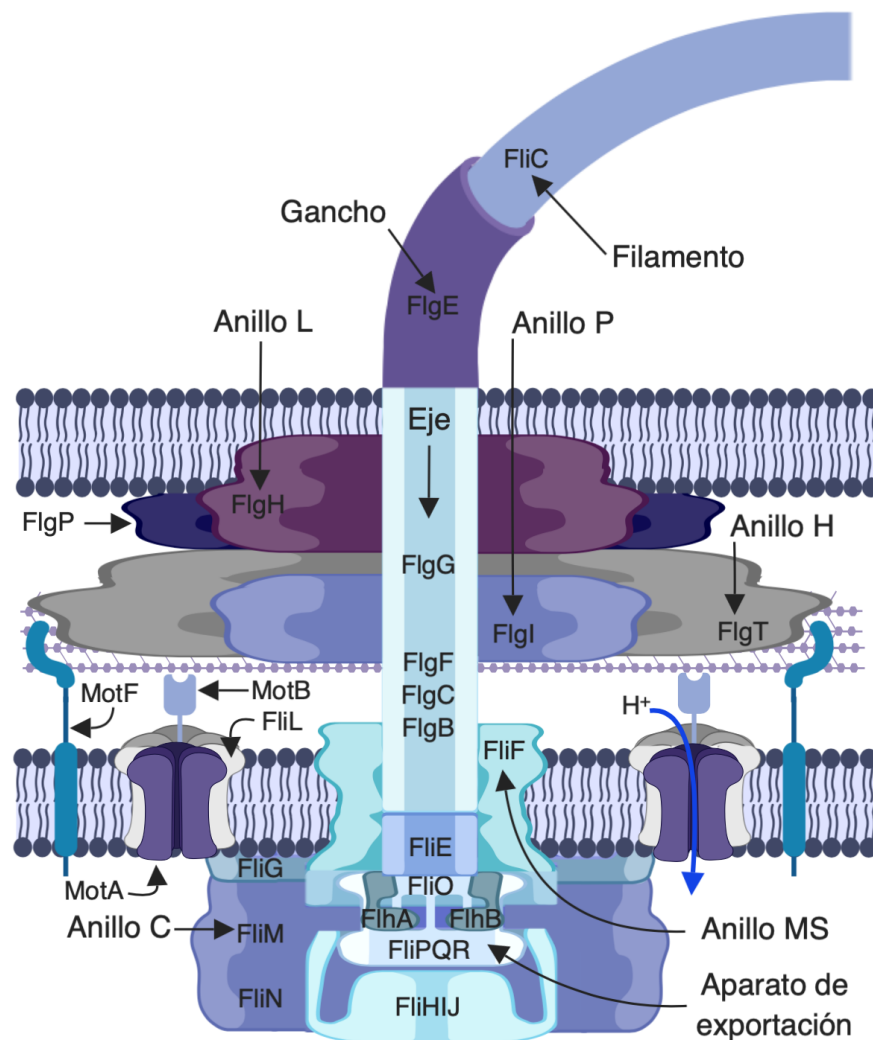


Figura 1: Modelo Flagelar. Esquema de los componentes del flagelo I de *R. sphaeoides*. Se muestran las proteínas que forman: el aparato de exportación (FliO, FliP, FliQ, FliR, FliH y FliB), el anillo MS (FliF), el anillo C (FliG, FliM y FliN), el anillo P (FlgI), el anillo L (FlgH), el anillo H (FlgT y FlgP), el eje proximal (FlgB, FlgC y FlgF), el eje distal (FlgG), el gancho (FlgE), el filamento (FliC), los estatores (MotA y MotB) y componentes membranales (MotF y FliL) (Modificado de Camarena y Dreyfus, 2020).

En el centro del anillo MS se encuentra el aparato de exportación flagelar, el cual pertenece a los sistemas de exportación tipo III. Está conformado por las proteínas FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR, y es el encargado de exportar las proteínas del eje, el gancho y el filamento (Figura 1) (Macnab, 2004; Minamino y Macnab, 1999 y Kuhlen *et al.*, 2018).

El eje flagelar atraviesa la envoltura celular, está conformado en su región proximal por FlgB, FlgC y FlgF, y por FlgG en la zona distal (Figura 1) (Homma *et al.*, 1990 a,b). El ensamblaje del eje es asistido por la proteína FlgJ, que actúa como andamiaje y tapa del eje, así como por su actividad de glucosaminidasa para penetrar la pared celular (Nambu *et al.*, 1999 y Zaloba *et al.*, 2016). Una vez que el eje alcanza la membrana externa, el gancho es ensamblado por fuera de la célula (Matsunami *et al.*, 2016).

El gancho es una estructura flexible que transmite el torque generado por el motor flagelar hacia el filamento y está constituido por subunidades de la proteína FlgE (Figura 1) (Matsunami *et al.*, 2016). La longitud del gancho es regulada por la proteína FliK, una vez que el gancho logra la longitud adecuada, FliK manda una señal para que la proteína del aparato de exportación FlhB sufra un corte en el espacio citoplásmico, lo cual se asocia a un cambio en la exportación de sustratos tipo eje/gancho a sustratos tipo filamento (Kutsukake *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 2003; Minamino *et al.*, 2006 y Erdhart *et al.*, 2010).

Finalizado el ensamblaje del gancho, las proteínas FlgK y FlgL son secretadas. Estas conectan el gancho y el filamento, permitiendo la transición de una estructura flexible como lo es el gancho, a una estructura rígida como el filamento (Homma *et al.*, 1990a y Hong *et al.*, 2018).

La última sección del flagelo es el filamento, el cual está formado por alrededor de 20,000 subunidades de la proteína FliC (Figura 1), que adopta su estado plegado mediante la acción de la tapa del filamento FliD (Aizawa, 1996 y Macnab, 1996).

Estatores flagelares

El estator está formado por múltiples unidades de complejos MotA/MotB. MotA posee cuatro hélices transmembranales (TM1, TM2, TM3 y TM4), un pequeño segmento periplásmico entre las hélices TM1-TM2 y TM3-TM4 (Figura 2), y una larga región citoplásmica entre las hélices TM2-TM3 que contiene una serie de aminoácidos cargados que son necesarios para la generación de torque (Dean, 1984; Blair y Berg, 1991; Zhou *et al.*, 1995 y Zhou y Blair, 1997).

A diferencia de MotA, MotB tiene un solo cruce transmembranal, que junto con las hélices TM3 y TM4 de MotA, forman un canal por donde se translocan protones (H^+) o sodio (Na^+) desde el espacio periplásmico hacia el espacio citoplásmico (Figura 2) (Sato y Homma, 2000; Kojima y Blair, 2004 y Braun *et al.*, 2004).

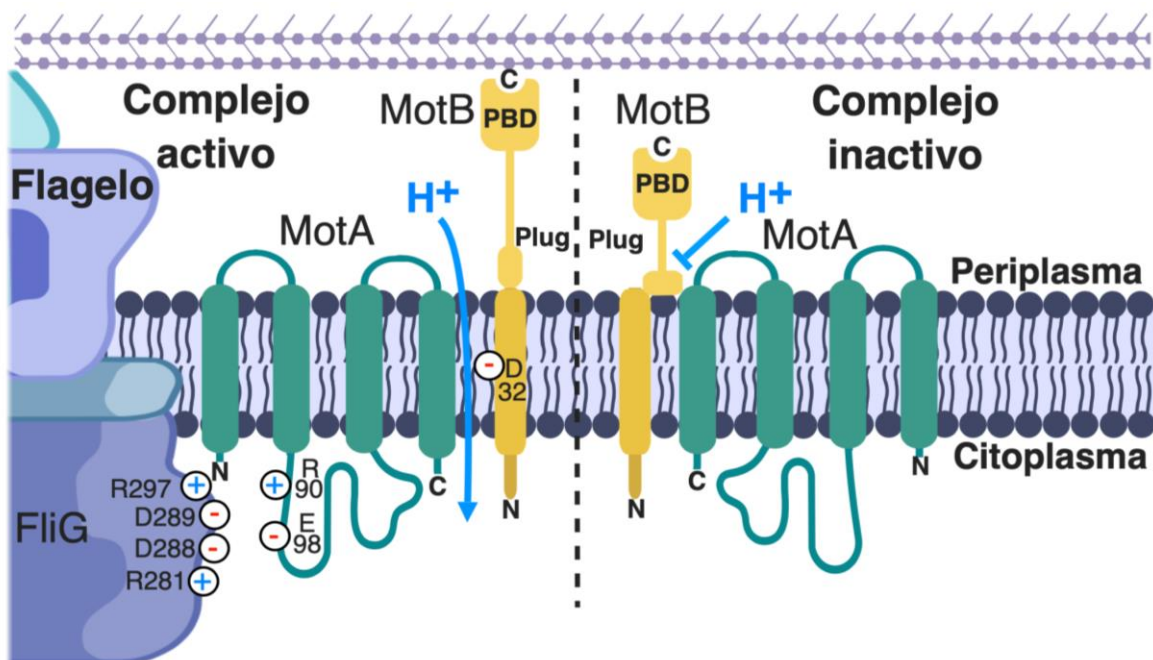


Figura 2: Activación de los estatores. Esquema representando la transición de complejos MotAB inactivos a complejos activos mediante la interacción con FliG. Se ilustran los cruces transmembranales de MotA y MotB, el canal de protones, la región “plug” y el dominio de unión a peptidoglicano de MotB (PBD). Se muestran los aminoácidos cargados relevantes para la interacción MotA-FliG (Modificado de Kojima y Blair, 2004 y Kojima *et al.*, 2009).

MotB en su sección periplásmica tiene dos regiones importantes. La primera de ellas, una región conocida como “plug”, (una hélice anfipática localizada después del dominio transmembranal de MotB) bloquea el paso de protones a través del canal para evitar el paso masivo de los mismos hasta que el complejo MotAB es reclutado en el rotor (Hosking *et al.*, 2006 y Morimoto *et al.*, 2010). La segunda región, es un dominio de unión a peptidoglicano de tipo “OmpA” que permite el anclaje de los estatores a la pared celular (Figura 2) (Kojima *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, por ensayos de solubilidad y entrecruzamiento, la estequiometría funcional del complejo MotAB era reconocida como 4MotA por 2MotB, que en conjunto forman dos canales por complejo (Kojima y Blair, 2004 y Braun *et al.*, 2004). Sin embargo, nueva evidencia de microscopía crioelectrónica sugiere que en realidad la estequiometría del complejo es de 5MotA por 2MotB. Dicho arreglo es asimétrico, por lo tanto, el modelo sugiere que existe una rotación procesiva de 36° en MotA en respuesta a la unión secuencial de protones o iones al complejo (Figura 3) (Santivieri *et al.*, 2020 y Deme *et al.*, 2020).

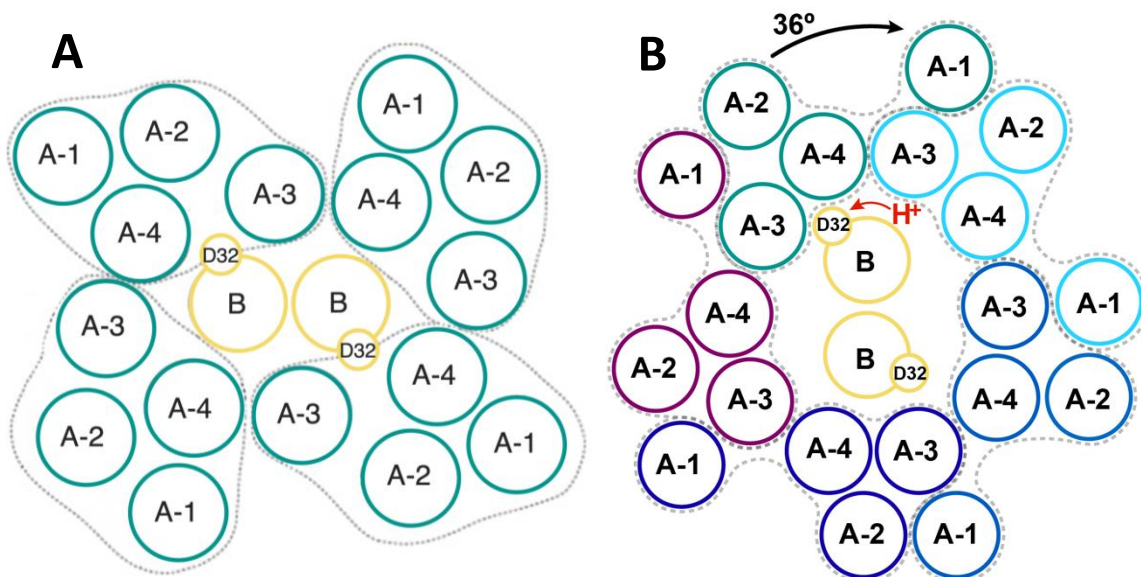


Figura 3: Estequiometría del complejo MotAB. A- Modelo estático de dos canales por complejo con estequiometría 4MotA/2MotB (Modificado de Kojima y Blair, 2004). B- Modelo dinámico de dos canales por complejo con estequiometría 5MotA/2MotB (Modificado de Santivieri *et al.*, 2020 y Deme *et al.*, 2020).

La transducción de energía electroquímica a energía química entre el flujo de protones a través del complejo MotAB y la rotación flagelar, está mediada por cambios conformacionales en MotA que ocurren por rondas de protonación y desprotonación del residuo conservado Asp32 de MotB (Figura 2) (Zhou et al., 1998a; Braun *et al.*, 1999; Kojima y Blair, 2001 y Che *et al.*, 2008). Los cambios conformacionales en el dominio citoplásmico de MotA generan el torque a través de interacciones electrostáticas con el carboxilo terminal de la proteína del anillo C, FliG (Figura 2) (Zhou *et al.*, 1998b).

El reclutamiento de los estatores a la base del flagelo es un proceso dinámico. Se ha estimado que al menos 11 complejos MotAB son acoplados alrededor del rotor (Reid *et al.*, 2006), y recientemente se ha demostrado que en el flagelo de *Vibrio* hasta 13 complejos pueden ser incorporados (Zhu *et al.*, 2020). Adicionalmente, se sabe que complejos activos MotAB son rápidamente intercambiados con una poza de complejos inactivos que se encuentran en la membrana interna (Figura 2) (Leake *et al.*, 2006).

Los estatores difunden libremente en la membrana interna en su estado inactivo y se requiere de una extensa remodelación en la estructura secundaria de MotB para su activación (Camarena y Dreyfus, 2020). Cuando hacen contacto con el rotor, la interacción entre MotA y FliG, induce la apertura del “plug” de MotB para permitir la translocación de protones a través del canal (Zhou *et al.*, 1998; Hosking *et al.*, 2006 y Morimoto *et al.*, 2010). Dicho cambio conformacional repercute en la extensión de la región periplásmica de MotB, permitiendo la unión a la pared celular mediante el domino de unión a peptidoglicano en MotB, de esta manera los estatores son anclados y así el torque puede ser generado (Figura 2) (Kojima *et al.*, 2018).

Componentes axiales

Alrededor del eje distal, se encuentran los anillos “P y L” formados por subunidades de las proteínas FlgI y FlgH respectivamente. El anillo P se encuentra en la región periplásmica, mientras que el anillo L se encuentra embebido en la membrana externa (Aizawa *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1990 y Akiba *et al.*, 1991).

Las proteínas que forman estos anillos no cruzan la membrana interna por medio del aparato de exportación flagelar, éstas son secretadas mediante el sistema de secreción SEC (Homma *et al.*, 1987). Los anillos P y L forman parte del cuerpo basal, pero se cree que son componentes que no giran y que rodean al eje como un buje (Hizuruki *et al.*, 2008).

Si bien los anillos P y L se encuentran presentes en la mayoría de las especies dentro del phylum proteobacteria, se han descrito componentes adicionales con funciones particulares dentro de ciertos grupos taxonómicos (Kaplan *et al.*, 2020).

Por mencionar algunos, en *Vibrio* fueron descritos los anillos H y T. El “anillo H” conformado por las proteínas FlgT, FlgP y FlgO, recubre los anillos P-L y es importante para la formación flagelar y motilidad bacteriana (Martinez *et al.*, 2009 y Terashima *et al.*, 2010). Mientras que el “anillo T” está constituido por MotX y MotY, y es relevante para el reclutamiento y estabilidad de los estatores (Terashima *et al.*, 2006 y Zhu *et al.*, 2020).

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria Gram negativa, púrpura no sulfurosa, fotoheterotrófica, perteneciente a la subclase alfa-3 de las proteobacterias. Al igual que otras especies de la familia Rhodobacteraceae, *R. sphaeroides* es una especie metabólicamente diversa que es capaz de crecer en diferentes condiciones, incluyendo la respiración aeróbica, la fotosíntesis anaeróbica anoxigénica, la fermentación, y por crecimiento diazotrófico (Dunstan *et al.*, 1982 y Blankenship *et al.*, 2006).

El genoma de la cepa de *R. sphaeroides* WS8 contiene dos cromosomas, uno de 3.14 Mbp y otro de 0.97 Mbp, respectivamente (Porter *et al.*, 2011). La particularidad de estos genomas es que contienen múltiples copias de ciertos genes, operones, o incluso loci enteros, que han sido incorporados al genoma y que el organismo utiliza en diversas situaciones. Un ejemplo de ello, son los dos sistemas flagelares de *R. sphaeroides* (Choudhary *et al.*, 1994).

R. sphaeroides posee dos sistemas flagelares, el sistema flagelar I (Fla1) y el sistema flagelar II (Fla2). El sistema Fla1, fue el primero en ser descrito y es el que *R. sphaeroides* expresa y utiliza en condiciones estándar de crecimiento en el laboratorio. Los genes del sistema Fla1 codifican las proteínas necesarias para la formación de un único flagelo subpolar (Figura 4 y 5A). Mientras que el sistema Fla2 se expresa en mutantes capaces de nadar en ausencia del sistema Fla1, o en presencia de algunos nutrientes en particular, como mezclas de aminoácidos. A diferencia del sistema Fla1, los genes del sistema Fla2 dan lugar a la formación de múltiples flagelos de localización polar (Figura 4 y 5B) (Poggio *et al.*, 2007).

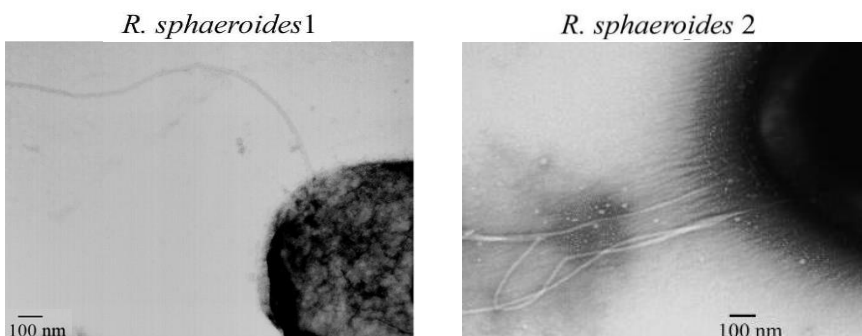


Figura 4: Sistemas flagelares de *Rhodobacter sphaeroides*. A- Microscopías electrónicas de las cepas WS8 y AM1 mostrando el número y la localización de los flagelos I (WS8) y II (AM1) respectivamente. (Modificado de Poggio *et al.*, 2007).

Jerarquía flagelar

La expresión y el ensamblaje del flagelo tiene un alto costo metabólico para la célula debido a la síntesis de múltiples proteínas que son necesarias para su funcionamiento. Por lo que estos procesos están finamente regulados por una cascada de regulación genética jerárquica que, en el caso del sistema flagelar I de *R. sphaeroides*, consta de cuatro clases de proteínas (Poggio *et al.*, 2005).

La clase I está conformada únicamente por el gen *fleQ*, el cual codifica para una proteína perteneciente a la familia conocida, por sus siglas en inglés, como “Enhancer binding protein” (EBP), la cual promueve la transcripción mediada por la RNA polimerasa asociada al factor sigma-54. Proteínas de este tipo se unen a sitios localizados 120-150 pb río arriba del promotor, generan curvatura entre el sitio de unión y el promotor, y hacen contacto con la RNA polimerasa- $\sigma 54$ unida al promotor, promoviendo la formación del complejo abierto. FleQ activa la expresión de operón de clase II, *fleT*, pero no del resto de los promotores flagelares dependientes de sigma-54 (Figura 7) (Poggio *et al.*, 2005).

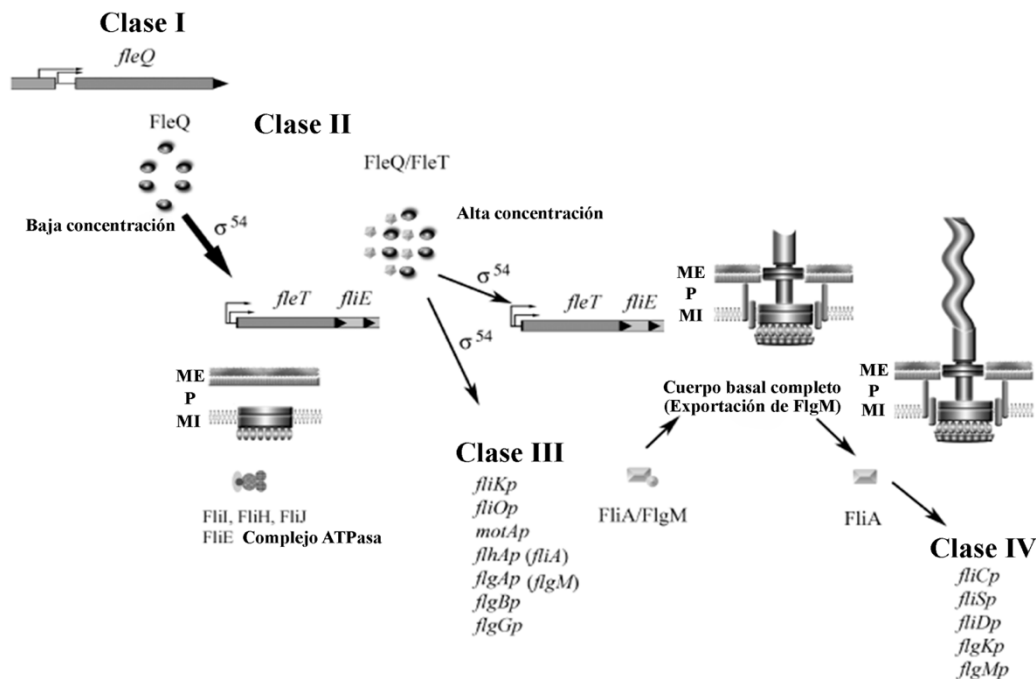


Figura 7: Jerarquía flagelar. Esquema ilustrando el modelo propuesto de la jerarquía flagelar en *R. sphaeroides*, mencionando algunos de los genes que representan las clases I, II, III y IV (Modificado de Poggio *et al.*, 2005).

El operón *fleT* (Clase II), incluye a los genes *fliE,F,G,H,I,J*, los cuales codifican para proteínas que corresponden al cuerpo basal y el aparato de exportación flagelar. FleT es una proteína activadora dependiente de sigma-54, la cual interactúa con FleQ y RpoN2 (σ -54). Las tres proteínas en conjunto llevan a cabo la transcripción de los genes de clase III (Figura 7) (Poggio *et al.*, 2005).

En la clase III, se encuentran el resto de los operones del sistema flagelar dependientes del factor σ -54. En ella se han identificado a los genes involucrados en la formación del cuerpo basal, del aparato de exportación, los estatores y componentes axiales. Así como los genes que codifican para el factor σ -28 (FliA) y su factor antisigma (FlgM), los cuales son requeridos para la transcripción de los genes que pertenecen a la clase IV (Figura 7) (Poggio *et al.*, 2005).

Por último, en la clase IV se encuentran los genes dependientes del factor σ -28, como *fliC* que codifica la flagelina, *fliS* que participa en el ensamblaje de las subunidades de FliC y *fliD* que codifica la tapa del filamento (Figura 7) (Poggio *et al.*, 2005).

MotF

Entre los genes *flhB* y *rpoN2* del sistema Fla1, se encuentra una zona predicha como un operón bicistrónico formado por los marcos de lectura abiertos RSP_0067 y RSP_6092. Río arriba del marco RSP_0067, se encuentra una secuencia que conserva los dinucleótidos GG y GC en las posiciones -24 y -12, respecto al sitio de inicio de la transcripción (Figura 8A). Similar a los promotores reconocidos por σ -54 (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta el contexto genómico en que se encuentra dicho operón, el primer estudio realizado en el laboratorio fue enfocado en analizar si alguno de los dos marcos de lectura abiertos estaba implicado en el nado dependiente del flagelo I de *R. sphaeroides*.

Para ello, ambos genes se interrumpieron con un casete de resistencia al antibiótico espectinomina (*aadA*) y se evaluó la capacidad de nado de las cepas mutantes generadas, observándose una alteración únicamente por la interrupción del marco RSP_0067 (Figura 8B) (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Existen dos posibles fenotipos de las cepas mutantes en genes involucrados en la motilidad. El fenotipo Fla-, en el cual las células no ensamblan el filamento, y el fenotipo Mot-, en el cual se ensambla el flagelo correctamente, pero no rota por alguna falla o deficiencia. Para determinar el fenotipo de la cepa mutante (VR1) en el marco RSP_0067, se realizaron ensayos de inmunodetección (*Western blot*) con anticuerpos policlonales anti-FliC (flagelina) a partir de alícuotas de cultivos de la cepa parental WS8 y la cepa mutante VR1, las cuales fueron sometidas a un proceso de agitación vigorosa con el fin de romper el filamento de la superficie celular. Se analizaron las fracciones del sobrenadante y el precipitado y se detectó señal de la flagelina en las dos fracciones de ambas cepas (Figura 8D) (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

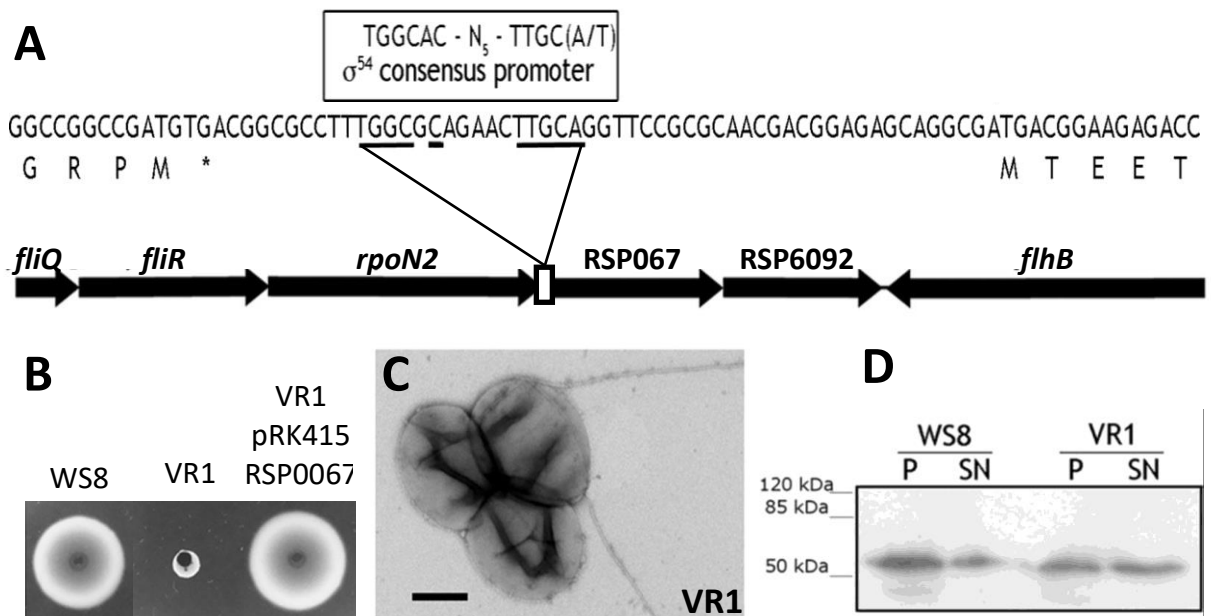


Figura 8: RSP0067 (*motF*). A- Esquema de la región promotora río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *motF*, señalando el promotor dependiente de sigma-54 y el contexto genómico en el que se encuentra. B- Caja de nado inoculada con las cepas WS8, VR1 (Δ *motF::aadA*) y VR1/pRK415_ *motF*_WT. C- Micrografía electrónica de células de la cepa VR1. D- Western blot anti-FliC con las fracciones del precipitado (P) y sobrenadante (SN) de las cepas WS8 y VR1 (Modificado de Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Además, mediante microscopía electrónica se detectaron células de la cepa VR1 con filamentos (Figura 8C). En conjunto, ambos resultados indican que en ausencia de la proteína codificada por el marco RSP_0067, las células ensamblan el flagelo pero son incapaces de rotarlo. Por lo tanto, la cepa posee un fenotipo Mot⁻, por lo cual se renombró el gen RSP_0067 como *motF* (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que el fenotipo Mot⁻ de la cepa VR1 puede ser suprimido por mutaciones secundarias en la región del “plug” de MotB. Dichas mutaciones reducen la hidrofobicidad de la hélice anfipática (plug), y se propuso que estos cambios permiten el paso de protones a través del canal. Esto sugiere que MotF podría regular la apertura y el cierre del canal, afectando directa o indirectamente la conformación de MotB. Dichas mutaciones supresoras también aparecen en ausencia de FlgT y FliL, lo que sugiere fuertemente que las tres proteínas (MotF, FlgT y FliL) están implicadas en la remodelación de la región periplásmica de MotB, promoviendo la activación del canal (Suaste-Olmos *et al.*, 2010; Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012 y Fabela *et al.*, 2013).

El promotor río arriba de *motF* es funcional. Ya que al clonar un fragmento que abarca la secuencia completa del gen, más 259 pb río arriba del sitio de inicio la traducción en el vector pRK415 en sentido opuesto al promotor *lac* presente en el vector, la capacidad de nado de la cepa VR1 se restablece (Figura 9A), lo que indica que MotF se transcribe desde su propio promotor (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

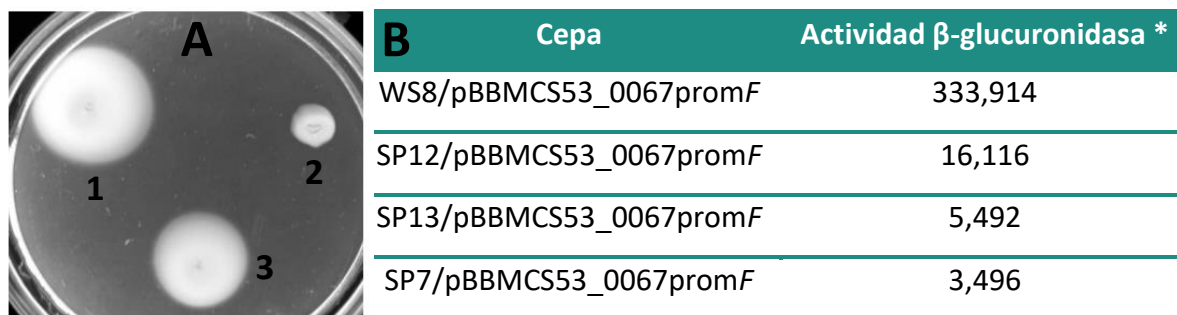


Figura 9: *motFp*. A- Caja de nado inoculada con las cepas (1) WS8, (2) VR1 (Δ *motF::aadA*) y (3) VR1/pRK415_MotF-inv. B- Actividad transcripcional de *motFp* en los fondos genéticos de las cepas WS8, SP12 (Δ *fleT::aadA*), SP13 (Δ *fleQ::Kan*) y SP7 (Δ *rpoN2::Kan*) (*nmoles de producto formado/min/mg de proteína) (Modificado de Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Para determinar a que clase de la jerarquía flagelar pertenece *motF*, su región reguladora fue clonada en el vector pBBMCS53 río arriba del gen reportero *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa. El plásmido resultante fue introducido en las cepas WS8, SP13 ($\Delta fleQ::Kan$), SP12 ($\Delta fleT::aadA$) y SP7 ($\Delta rpoN2::Kan$), en donde los resultados de las actividades enzimáticas indicaron que la transcripción de *motF* requiere de la presencia de FleQ y FleT. Por lo tanto, el promotor *motFp* pertenece a la clase III de la jerarquía flagelar (Figura 9B) (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

motF codifica para un polipéptido de 239 aminoácidos. El análisis de la secuencia primaria predice un solo cruce transmembranal, que se extiende desde el residuo 54 al 74. En el estudio realizado por Ramírez-Cabrera *et al* (2012), se fusionó la proteína verde fluorescente GFP a los extremos amino (GFP-MotF) y carboxilo (MotF-GFP) terminal de MotF. Esto con base en que ha sido reportado que la proteína GFP, solo se pliega correctamente en el citoplasma, por lo tanto, la fusión que presentara fluorescencia revelaría la topología de la proteína MotF. Ambas fusiones fueron expresadas en las cepas WS8 y VR1, en donde se observó que solo la fusión GFP-MotF es estable; ya que restableció la capacidad de nado de la cepa VR1, generó un foco de fluorescencia por célula, y dicho foco colocalizó con el flagelo (Figura 10A, B y C) (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

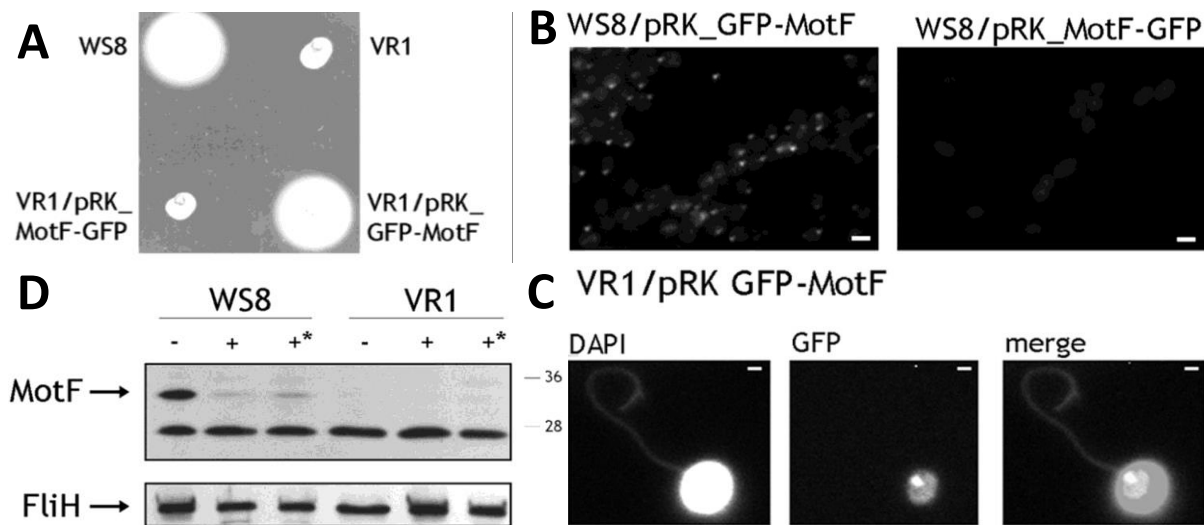


Figura 10: Topología de MotF. A- Caja de nado inoculada con las cepas WS8, VR1 ($\Delta motF::aadA$), VR1/pRK415_MotF-GFP y VR1/pRK415_GFP-MotF. B- Microscopía de fluorescencia de células de la cepa WS8 expresando las fusiones GFP-MotF y MotF-GFP. C- Colocalización entre la fusión GFP-MotF y el filamento teñido con DAPI. (Barra = 1 μ m) D- Western blot anti-MotF y anti-FliH (control) a partir de esferoplastos de células de las cepas WS8 y VR1; sin proteinasa K (-), con proteinasa K incubada 10 min (+) y 20 min (+*) (Modificado de Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

Además, en un ensayo de acceso a proteasas se observó la degradación de MotF cuando esferoplastatos de la cepa WS8 fueron sometidos a un tratamiento con proteinasa K (Figura 10D). Estos resultados, en conjunto con la evidencia antes mencionada sugieren que el segmento amino terminal de MotF se encuentra en el citoplasma, mientras la región carboxilo terminal se localiza en el espacio periplásmico. Lo cual es relevante para hipotetizar posibles interacciones entre MotF y proteínas que se encuentren en las fracciones citoplásmicas o periplásmicas (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012).

FlgT

Estudios pioneros realizados en *V. cholerae*, permitieron identificar un marco de lectura abierto (VC2208) involucrado en la motilidad, cuya eliminación provoca parálisis celular. El marco fue nombrado *flgT*, ya que por análisis de microscopía de la cepa $\Delta flgT$, se demostró que las células pierden el filamento (Figura 11A) (Cameron *et al.*, 2008).

Posteriormente, se observó que FlgT forma una estructura anular que rodea los anillos P y L (Figura 11B). La nueva estructura se nombró como “anillo H”, participa en el anclaje del cuerpo basal a la membrana externa, en la construcción eje/gancho, y funciona como andamiaje de otras proteínas flagelares como MotX, MotY, FlgP y FlgO (Figura 11C) (Terashima *et al.*, 2010 y Zhu *et al.*, 2020).

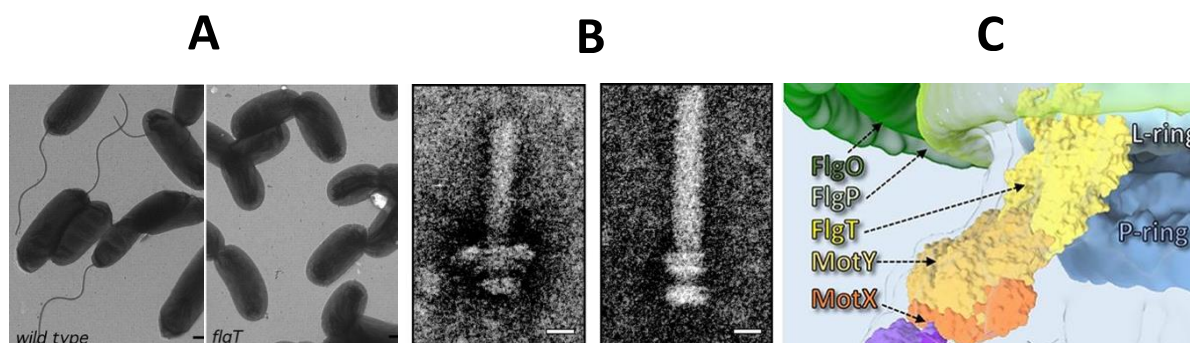


Figura 11: FlgT en *Vibrio*. A- Micrografías electrónicas de células de las cepas de *V. cholerae* C60706 (WT) y mutante $\Delta flgT$ respectivamente. B- Micrografías electrónicas de cuerpos basales purificados de las cepas de *V. alginolyticus* KK148 (WT $\Delta flhG$) y TH7 (KK148 $\Delta flgT$). C- Modelo tridimensional generado a partir de microscopía crioelectrónica del flagelo de *V. alginolyticus* (KK148) (Modificado de Cameron *et al.*, 2008; Terashima *et al.*, 2010 y Zhu *et al.*, 2020).

En *R. sphaeroides* existe un homólogo a FlgT, codificado por el marco RSP_6086. Por estudios recientes en el laboratorio, se sabe que células mutantes en este gen son incapaces de nadar pero ensamblan correctamente el flagelo (Figura 12A y B), contrario a lo observado en *Vibrio* (Fabela *et al.*, 2013).

En el mismo estudio se demostró que se requiere de FlgT para que la fusión GFP-MotF se localice en la membrana, ya que en el fondo genético de la cepa SF3 ($\Delta flgT::aadA$) no se detectaron puntos de fluorescencia (Figura 12D). Además, mediante un ensayo de Western blot utilizando cuerpos basales aislados de las cepas WS8 y SF3, se pudo detectar presencia de MotF en la cepa WS8, pero no así en la cepa SF3 (Figura 12C). Lo que indica que se requiere de FlgT para el reclutamiento de MotF al cuerpo basal y sugiere una posible interacción entre ambas proteínas (Fabela *et al.*, 2013).

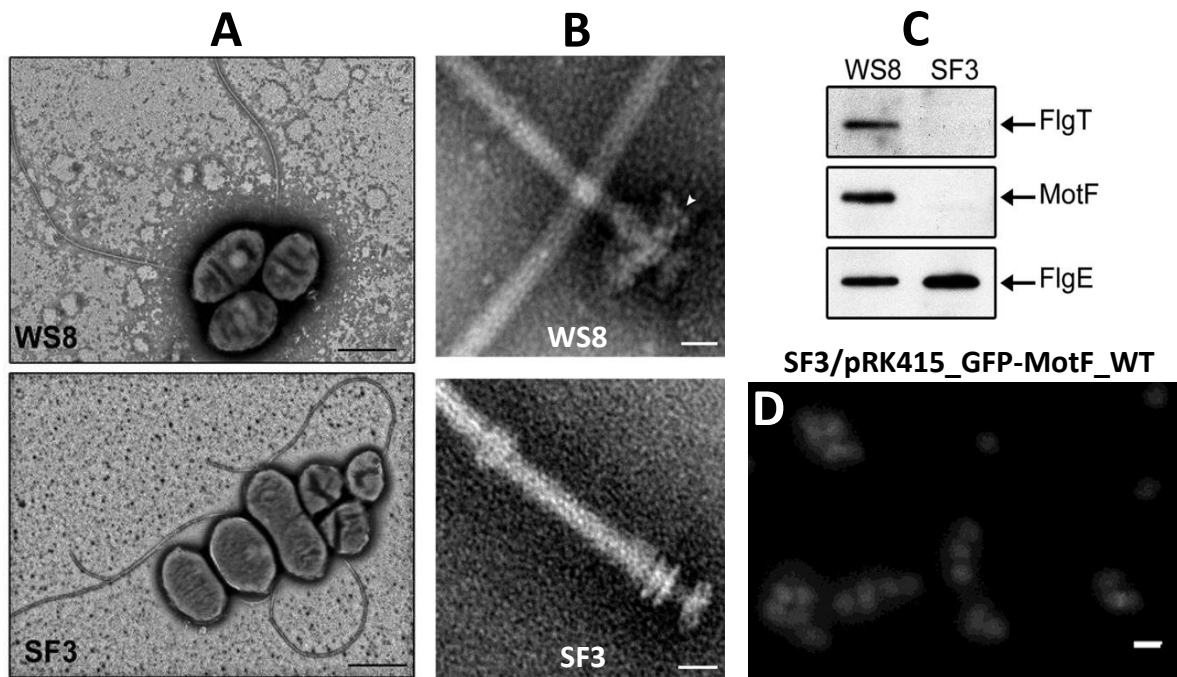


Figura 12: FlgT en *R. sphaeroides*. A- Micrografías electrónicas de células de las cepas WS8 (WT) y SF3 ($\Delta flgT::aadA$). B- Micrografías electrónicas de cuerpos basales purificados de las cepas WS8 y SF3. Con una flecha blanca se señala el anillo H. C- Western blot anti-FlgT, anti-MotF y anti-FlgE (control) con extractos de cuerpos basales purificados de las cepas WS8 y SF3. D- Microscopía de fluorescencia de células de la cepa SF3/pRK415_GFP-MotF_WT (Modificado de Fabela *et al.*, 2013).

Planteamiento del problema

Estudios reportados demostraron que la región que comprende los residuos 214 y 239 ubicados en el dominio caboxilo terminal, es relevante para la funcionalidad de MotF (Meza, 2015). Particularmente, se observó que el nado es dependiente de la tirosina 238, ya que cuando este residuo se sustituye por alanina o glicina, MotF no es capaz de restablecer el nado de la cepa mutante VR1 ($\Delta motF::aadA$) (Figura 13A). Esta pérdida de función es resultado de la deslocalización de la proteína, ya que al expresar en la cepa VR1 las versiones GFP-MotF mutantes, se observó una disminución significativa en el número de células con un punto de fluorescencia en comparación con la versión silvestre (Figura 13B). Además, en las pocas células que presentaron dicho punto, éste no colocaliza con el flagelo (Figura 13C) (Rodríguez-Méndez, 2018).

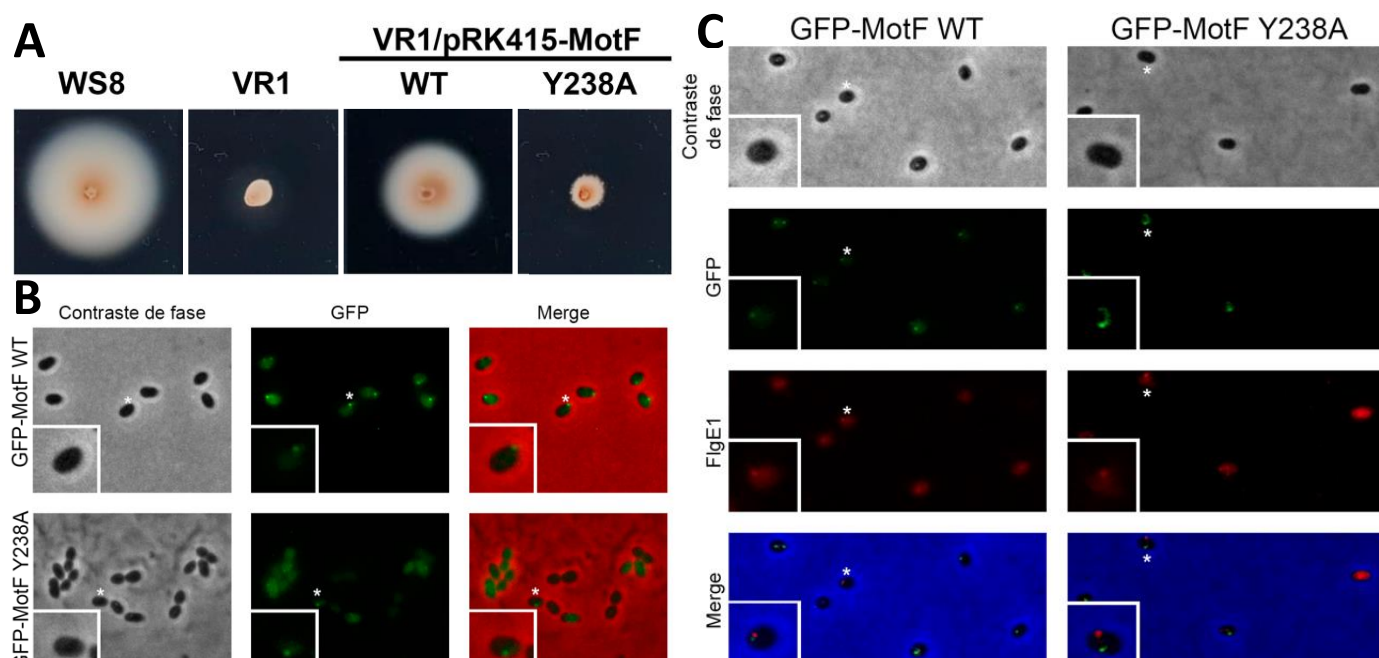
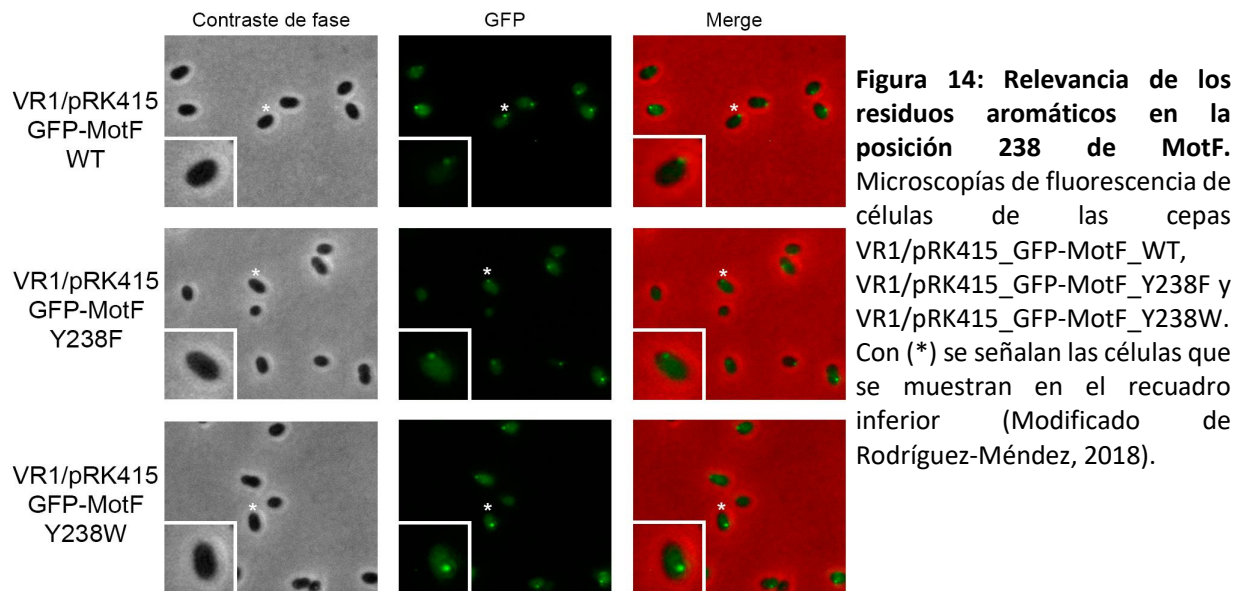


Figura 13: Relevancia de la tirosina 238 de MotF para la localización y el nado. A- Caja de nado inoculada con las cepas WS8, VR1 ($\Delta motF::aadA$), VR1/pRK415_MotF_WT y VR1/pRK415_MotF_Y238A. B- Microscopías de fluorescencia de células de las cepas VR1/pRK415_GFP-MotF_WT y VR1/pRK415_GFP-MotF_Y238A. Con (*) se señalan los puntos de fluorescencia. C- Ensayo de colocalización por microscopía de fluorescencia con las cepas antes mencionadas (B), entre las proteínas GFP y FlgE1 (teñida con Alexa Fluor 546 acoplada al anticuerpo anti-FlgE1) (Modificado de Rodríguez-Méndez, 2018).

Para determinar si la cadena lateral de la tirosina 238 ejercía un papel importante en la localización de MotF, se sustituyó este residuo por otros con cadenas laterales aromáticas, como la fenilalanina y el triptófano. Dichas variantes de MotF restablecen el nado de la cepa VR1 y el número de células con un punto de fluorescencia es similar a la versión silvestre (Figura 14) (Rodríguez-Méndez, 2018).



Además, en dicho estudio se demostró que todas las versiones mutantes mantienen la dependencia de FlgT para poder localizarse (Rodríguez-Méndez, 2018), tal como sucede con la versión silvestre de MotF (Fabela et al., 2013).

Estos resultados indicaron que MotF requiere de una cadena lateral aromática en la posición 238, y que posiblemente este residuo puede interactuar con otro residuo de las mismas características presente en FlgT. Sugiriendo que la interacción entre MotF y FlgT puede ocurrir mediante un apilamiento de anillos aromáticos (Rodríguez-Méndez, 2018)

Con base en lo anterior, se decidió evaluar si versiones mutantes de MotF en la tirosina 238 son capaces de interactuar con FlgT mediante ensayos *in vitro*. Además, se valoró el posible sitio de interacción entre MotF y FlgT mediante mutaciones puntuales dirigidas hacia residuos aromáticos conservados en FlgT (Rodríguez-Méndez, 2018).

Hipótesis

Residuos aromáticos altamente conservados en FlgT son necesarios para la interacción con la tirosina 238 de MotF. Dicha interacción es exclusiva de la familia Rhodobacteraceae y ocurre mediante apilamiento de anillos aromáticos.

Objetivos

Generales:

1. Caracterizar el papel de residuos aromáticos altamente conservados en los diferentes dominios de FlgT en la interacción con la Y238 de MotF.
2. Analizar la dinámica de unión al peptidoglicano de MotB en diferentes fondos genéticos.
3. Determinar el origen filogenético de MotF en conjunto con el sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*.

Particulares:

1. Realizar un análisis bioinformático para determinar los residuos aromáticos conservados en proteínas homólogas a FlgT.
2. Obtener construcciones con mutaciones puntuales en los residuos aromáticos conservados de FlgT.
3. Caracterizar el fenotipo de nado y realizar ensayos de inmunodetección con las cepas que expresan las versiones mutantes de FlgT.
4. Probar mediante ensayos de doble híbrido en levaduras las interacciones entre diferentes versiones de MotF y FlgT.
5. Aislar peptidoglicano de diferentes fondos genéticos y analizar la presencia de MotB mediante ensayos de inmunodetección.

Materiales y métodos

Tabla 1. Cepas

Espece/Cepa	Descripción/Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Cepa para clonación	Invitrogen
HB101	Cepa para clonación	Boyer y Roulland, 1969
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8	Silvestre; Nal espontánea	Sockett <i>et al.</i> , 1990
VR1	Derivada de WS8; Δ motF:: <i>aadA</i>	Ramírez <i>et al.</i> , 2012
SF3	Derivada de WS8; Δ flgT:: <i>aadA</i>	Fabela <i>et al.</i> , 2013
FS3	Derivada de WS8; Δ fliL:: <i>aadA</i>	Suaste <i>et al.</i> , 2010
FS4	Derivada de WS8; Δ motB:: <i>Kan</i>	Suaste <i>et al.</i> , 2010
FS6	Derivada de WS8; Δ motA:: <i>aadA</i>	Colección de laboratorio
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , Δ <i>gal4</i> , Δ <i>gal80</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-</i> <i>HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
Y187	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-</i> <i>101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , Δ <i>gal4</i> , <i>met</i> , Δ <i>gal80</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993

Tabla 2. Plásmidos

#	Plásmido	Descripción	Referencia
1	pTZ18R	Vector de clonación; Amp ^R	Pharmacia
2	pTZ18R_MotF_WT	Derivado de (1) portando el alelo de <i>motF</i> silvestre.	Ramírez-Cabrera <i>et al.</i> , 2012
3	pTZ18R_MotF_Y238A,G,F,W,H	Derivados de (1) portando el alelo de <i>motF</i> con la mutación indicada en el residuo 238	Rodríguez-Méndez, 2018
4	pTZ18R_MotF_Y238L	"	Este trabajo
5	pTZ18R_MotF_Y238I	"	"
6	pTZ18R_MotF_Y238R	"	"
7	pTZ18R_MotF_Y238K	"	"
8	pTZ18R_MotF_Y238D	"	"
9	pTZ18R_MotF_Y238E	"	"
10	pTZ18R_MotF_Y238S	"	"
11	pTZ18R_MotF_Y238T	"	"
12	pRK415	Vector de expresión, Tc ^R	Keen <i>et al.</i> , 1988
13	pRK415 (Xba ⁻) (EcoR1 ⁻)	Derivado de (12) sin los sitios XbaI y EcoRI	Colección
14	pRK415_MotF	Derivado de (12) portando el alelo de <i>motF</i> silvestre	Ramírez-Cabrera <i>et al.</i> , 2012
15	pRK415_MotF_Y238A,G,F,W,H	Derivados de (12) portando el alelo de <i>motF</i> con la mutación indicada en el residuo 238	Rodríguez-Méndez, 2018
16	pRK415_MotF_Y238L	"	Este trabajo
17	pRK415_MotF_Y238I	"	"
18	pRK415_MotF_Y238R	"	"
19	pRK415_MotF_Y238K	"	"
20	pRK415_MotF_Y238D	"	"
21	pRK415_MotF_Y238E	"	"
22	pRK415_MotF_Y238S	"	"
23	pRK415_MotF_Y238T	"	"

24	pTZ18R_GFP-fase (STOP ^r)	Derivado de (1) portando el alelo silvestre de GFP sin el codón de paro.	Ramírez-Cabrera <i>et al.</i> , 2012
25	pTZ18R_GFP-MotF_Y238A,G,F,W	Derivados de (24) portando el alelo de <i>motF</i> con la mutación indicada en el residuo 238	Rodríguez-Méndez, 2018
26	pTZ18R_GFP-MotF_Y238L	“	Este trabajo
27	pTZ18R_GFP-MotF_Y238I	“	“
28	pTZ18R_GFP-MotF_Y238H	“	“
29	pTZ18R_GFP-MotF_Y238R	“	“
30	pTZ18R_GFP-MotF_Y238K	“	“
31	pTZ18R_GFP-MotF_Y238D	“	“
32	pTZ18R_GFP-MotF_Y238E	“	“
33	pTZ18R_GFP-MotF_Y238S	“	“
34	pTZ18R_GFP-MotF_Y238T	“	“
35	pRK415_GFP-MotF_WT	Derivado de (12) portando el alelo de la fusión entre <i>gfp</i> y <i>motF</i> silvestre	Ramírez-Cabrera <i>et al.</i> , 2012
36	pRK415_GFP-MotF_Y238A,G,F,W	Derivados de (12) portando el alelo de la fusión entre <i>gfp</i> y <i>motF</i> con la mutación indicada en el residuo 238	Rodríguez-Méndez, 2018
37	pRK415_GFP-MotF_Y238L	“	Este trabajo
38	pRK415_GFP-MotF_Y238I	“	“
39	pRK415_GFP-MotF_Y238H	“	“
40	pRK415_GFP-MotF_Y238R	“	“
41	pRK415_GFP-MotF_Y238K	“	“
42	pRK415_GFP-MotF_Y238D	“	“
43	pRK415_GFP-MotF_Y238E	“	“
44	pRK415_GFP-MotF_Y238S	“	“
45	pRK415_GFP-MotF_Y238T	“	“
46	pTZ18R_FlgT_WT	Derivado de (1) portando el alelo el alelo de <i>flgT</i> silvestre.	Fabela <i>et al.</i> , 2013

47	pTZ18R_FlgT_F32A	Derivado de (46) portando el alelo de <i>flgT</i> con la mutación en el residuo indicado	Este trabajo
48	pTZ18R_FlgT_F315A	"	"
49	pTZ18R_FlgT_F32A-F315A	Derivado de (47) portando el alelo de <i>flgT</i> con las mutaciones en los residuos indicados	"
50	pRK415_FlgT_WT	Derivado de (12) portando el alelo el alelo de <i>flgT</i> silvestre.	Fabela <i>et al.</i> , 2013
51	pRK415_FlgT_F32A	Derivado de (12) portando el alelo de <i>flgT</i> con la mutación en el residuo indicado	Este trabajo
52	pRK415_FlgT_F315A	"	"
53	pRK415_FlgT_F32A-F315A	"	"
54	pGADT7_AD	Vector de expresión usado en <i>S. cerevisiae</i> para ensayos de doble híbrido portando los alelos <i>LEU2</i> y <i>GAL4-AD</i> ; Amp ^R	Chien <i>et al.</i> , 1991
55	pGBKT7_BD	Vector de expresión usado en <i>S. cerevisiae</i> para ensayos de doble híbrido portando los alelos <i>TRP1</i> y <i>GAL4-BD</i> ; Kan ^R	Chien <i>et al.</i> , 1991 y Louvet <i>et al.</i> , 1997
56	pGADT7_AD-AntT	Derivado de (54) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-AD</i> y <i>SV40AntT</i>	Iwabuchi, 1993 y Fields, 1993
57	pGBKT7_BD-p53	Derivado de (55) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-BD</i> y <i>Trp53</i>	Iwabuchi, 1993 y Fields, 1993
58	pGBKT7_BD-Lam	Derivado de (55) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-BD</i> y <i>Lam</i>	Bartel <i>et al.</i> , 1993
59	pGADT7_AD-FlgT	Derivado de (54) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-BD</i> y <i>flgT</i>	Fabela <i>et al.</i> , 2013
60	pGBKT7_BD-FlgT	Derivado de (55) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-BD</i> y <i>flgT</i>	Fabela <i>et al.</i> , 2013
61	pGADT7_AD-MotFΔ1-98_WT	Derivado de (54) portando el alelo de la fusión <i>GAL4-AD</i> y <i>motFΔ1-98 silvestre</i>	"

62	pGADT7_AD-MotFΔ1-98 _Y238A	“	Este trabajo
63	pGADT7_AD-MotFΔ1-98 _Y238G	“	“
64	pGADT7_AD-MotFΔ1-98 _Y238F	“	“

Tabla 3. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia
RSP0067F	5'- GCTCTAGACGATGTGACGGCGCCTTTGGC -3'
0067fwd (fase GFP-M)	5'- GCTCTAGAACGGAAGAGACCGACGACCC -3'
MotF Y238A	5'- GCGAATTCTCACGGCGCACGGATCGGATTGTCGGCCGC -3'
MotF Y238G	5'- CGAATTCTCACGGGCCACGGATCGGATTGTCGGCCGC -3'
MotF Y238F	5'- CGAATTCTCACGGGAAACGGATCGGTTGTCGGCC -3'
MotF Y238W	5'- CGAATTCTCACGGCCAACGGATCGGTTGTCGGCC -3'
MotF Y238L	5'- CGAATTCTCACGGCAGACGGATCGGATTGTCGGC -3'
MotF Y238I	5'- CGAATTCTCACGGGATACGGATCGGATTGTCGGC -3'
MotF Y238H	5'- CGAATTCTCACGGATGACGGATCGGTGTCGGCC -3'
MotF Y238R/S	5'- CGAATTCTCACGGGCKACGGATCGGATTGTCGGC -3'
MotF Y238K/E	5'- CGAATTCTCACGGCTYACGGATCGGATTGTCGGC -3'
MotF Y238D	5'- CGAATTCTCACGGGTACGGATCGGATTGTCGGC -3'
MotF Y238T	5'- CGAATTCTCACGGCGTACGGATCGGATTGTCGGC -3'
FlgT F32A Fwd	5'- GTCGAGGCCGAGGGCGCCGCCATGGTCGCGGGC -3'
FlgT F32A Rev	5'- GCCCGCGACCATGGCGGGCCCTCGGCCTCGAC -3'
FlgT F315A Fwd	5'- CCGGGCAGCCTCGCCGCCACCGCGGACGGCGGC -3'
FlgT F315A Rev	5'- GCCGCCGTCCGCGGTGGCGGGGAGGCTGCCCGG -3'
pG67FCOOH	5' GAATTCACCGAGCTCGGCGAGGCCATCG 3'

K = G y T **Y** = C y T

Tabla 4. Antibióticos

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Espectinomicina (Spc)	100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamicina (Kan)	50 µg/ml	25 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	15 µg/ml	1 µg/ml
Ampicilina (Amp)	100 µg/ml	-

Medios

Medio rico LB

Medio preparado con 1% de bacto-triptona, 1% de cloruro de sodio y 0.5% de extracto de levadura, disuelto en agua bidestilada y esterilizado en autoclave. Para la preparación de medio sólido se adicionó 1.5% de bacto-agar.

Medio YPDA

Preparado con 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa y 0.003% de adenina, disuelto en agua bidestilada y esterilizada en autoclave. Para la preparación de medio sólido se adicionó 1.5% de bacto-agar.

Medio SD

Medio sintético mínimo preparado según las indicaciones del fabricante (Clontech) complementado con los suplementos apropiados (-LD, -LTH y -LTHA). Para la preparación de medio sólido se adicionó 1.5% de bacto-agar.

Medio mínimo Sistrom (Sis)

Preparado con 15 mM de ácido succínico, 0.67 mM de ácido glutámico, 0.25 mM de ácido aspártico, 8.5 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fosfato dibásico de potasio, 3.87 mM de sulfato de amonio, 1.04 mM de ácido nitriloacético, 1.2 mM de sulfato de magnesio, 0.23 mM de cloruro de calcio, 7 mM de sulfato ferroso, 0.16 mM de molibdato de amonio y 0.1 ml/L de elementos traza. El pH ajustado a 7 y una vez esterilizado es adicionado con 0.1 ml/L de solución de vitaminas y la cantidad de antibióticos correspondiente para cada cepa.

Solución de elementos traza

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

Solución de vitaminas

Consta de 1% de ácido nicotínico, 0.5% de tiamina y 0.01% de biotina, disuelta en agua bidestilada y esterilizada por filtración.

Condiciones de cultivo

Rhodobacter sphaeroides se creció en medio mínimo de Siström (Sis) a 30°C en oscuridad con una agitación de 200 rpm. *Escherichia coli* se creció en medio LB a 37°C en agitación. *Saccharomyces cerevisiae* se creció en los medios YPDA y SD a 30°C. Los ensayos de nado se llevaron a cabo a 30°C en oscuridad en placas de nado con medio Sis.

Obtención de cepas

Transformación de *E. coli* por electroporación

Alícuotas de células competentes de *E. coli* de la cepa TOP10 fueron utilizadas para la transformación. Los plásmidos por transformar fueron mezclados con 50 µL de células competentes, se colocó la mezcla en una celda fría para electroporación, la celda se sometió a un pulso de 1.8 KV en un electroporador y las células se recuperaron en 1 mL de medio LB 1 hora a 37°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 2 min, se decantó el medio, se resuspendieron las células y se espatularon en su respectivo medio de selección.

Minipreparaciones de plásmido

A partir de un cultivo crecido toda la noche (ON) en medio LB con antibiótico, se tomó un volumen de 1.5 mL, se centrifugó, se decantó el medio y las células se resuspendieron. Se añadió 500 µL de STET (Solución con 8% de sacarosa, 5% de detergente Tritón y 50 mM Tris-HCl, disuelta en agua bidestilada a pH 8) y 30 µL de lisozima (10 µg/mL). Se incubó la muestra en agua hirviendo durante 1 min y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 13 min. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con 500 µL de isopropanol, se agitó vigorosamente en vortex, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con 400 µL de etanol frío al 75% durante 2 min por inversión. Finalmente, el precipitado se secó a 75°C durante 15 min y se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada estéril.

Purificación de plásmidos

Se utilizó el estuche “QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol” de la compañía QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante.

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Se purificaron fragmentos de DNA mediante electroforesis en un gel de agarosa, se utilizó el estuche “QIAquick gel-extraction” siguiendo el protocolo provisto por el fabricante QIAGEN.

Conjugación

Para conjugar los diferentes plásmidos obtenidos en este trabajo se utilizaron las cepas receptoras VR1 y SF3 de *R. sphaeroides*, donadoras TOP10 de *E. coli* (portando los diferentes plásmidos pRK415_) y la cepa HB101 (Helper). Las cepas por conjugar fueron crecidas hasta alcanzar una DO de 0.6, se tomaron volúmenes de 1 mL de cada una de las cepas, se centrifugaron 2 min a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de medio LB fresco. El procedimiento anterior se repitió dos veces más

con el fin de lavar y remover los antibióticos presentes en los cultivos. Posteriormente las pastillas se resuspendieron y se juntaron en un solo tubo Eppendorf con 1 mL de medio LB, se centrifugó, se decantó el sobrenadante, y se resuspendió en el medio remanente, se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa en una caja de medio sólido LB sin antibióticos y se incubó a 30°C toda la noche. Finalmente, la membrana se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 1 mL de LB, las células se resuspendieron mediante agitación vigorosa con vortex, se tomaron 20 µL y se espatularon en cajas de medio LB adicionadas con ácido nalidíxico y tetraciclina.

Construcción de plásmidos

pTZ18R_MotF_Y238L, Y238I, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T.

Estas construcciones con las mutaciones puntuales en el residuo 238 de MotF se obtuvieron mediante la técnica de mutagénesis dirigida. Para las reacciones de PCR se utilizó como templado el plásmido pTZ18R_MotF_WT [2] (Tabla 2), en todas ellas se usó el oligonucleótido “RSP0067F” que contiene un sitio XbaI, y se usaron los distintos oligonucleótidos reversos que contienen cada una de las mutaciones indicadas más un sitio EcoRI inmediato al codón de paro (Tabla 3).

Los productos de PCR se purificaron, se digirieron con XbaI y EcoRI, se clonaron en el vector pTZ18R [1] (Tabla 2) previamente digerido con las mismas enzimas y se transformaron en la cepa de *E. coli* TOP10 (Tabla 1). Posteriormente se hicieron minipreparaciones de plásmido y digestiones enzimáticas para seleccionar clonas recombinantes, se purificaron los plásmidos de las clonas candidatas y se secuenciaron (Secuenciación Sanger con el oligonucleótido “M13Fwd”) para verificar las mutaciones deseadas. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [4-11] (Tabla 2).

pRK415_MotF_Y238L, Y238I, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T.

Una vez verificada la mutación, los plásmidos [4-11] (Tabla 2) se digirieron con XbaI y EcoRI para liberar los insertos, los cuales se purificaron y se clonaron en el vector pRK415 [12] (Tabla 2) digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa TOP10 (Tabla 1) y se seleccionaron clonas recombinantes. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [16-23] (Tabla 2) y se conjugaron en la cepa VR1 ($\Delta motF::aadA$) (Tabla 1).

pTZ18R_GFP-MotF_Y238L, Y238I, Y238H, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T.

Para generar las fusiones entre la proteína fluorescente GFP y las versiones mutantes de MotF, se realizaron PCRs usando como templados los plásmidos [3^(Y238H) y 4-11] (Tabla 2), el oligonucleótido “0067fwd (Fase GFP-M)” y los oligonucleótidos reversos correspondientes para cada mutante (Tabla 3).

Se purificaron los productos de PCR y se clonaron en el plásmido pTZ18R_GFP-fase (STOP⁻) [24] (Tabla 2), el cual contiene un alelo del gen *gfp* clonado HindIII-XbaI que no contiene el codón de paro y que en su lugar tiene un sitio XbaI. Este plásmido se digirió con las enzimas XbaI y EcoRI, se purificó y en el se clonaron los distintos alelos mutantes de *motF* antes mencionados. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [26-34] (Tabla 2).

pRK415_GFP-MotF_Y238L, Y238I, Y238H, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T.

Se purificaron los plásmidos con las diferentes fusiones [25^(Y238H) y 26-34] (Tabla 2) y se digirieron con las enzimas HindIII y EcoRI para liberar el inserto completo de las fusiones GFP-MotF, se purificaron los fragmentos y se clonaron en el vector pRK415 [12] (Tabla 2) digerido previamente con las mismas enzimas. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa TOP10 (Tabla 1) y se seleccionaron colonias recombinantes. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [37-45] (Tabla 2) y se conjugaron con la cepa VR1 ($\Delta motF::aadA$) (Tabla 1).

pTZ18R_FlgT_F32A, F315A y F31A-F315A.

Estos plásmidos se obtuvieron mediante la técnica de mutagénesis dirigida por “Quick-Change”. Dicha técnica consiste en la amplificación completa del templado mediante PCR, utilizando oligonucleótidos complementarios que llevan la mutación deseada, mediante la polimerasa Pfu-turbo, y los productos se digirieron con la enzima DpnI para eliminar el templado.

Para obtener los plásmidos pTZ18R_FlgT_F32A y F315A, [47 y 48] (Tabla 2). se utilizó como templado el plásmido pTZ18R_FlgT_WT [46] (Tabla 2) y los oligonucleótidos “FlgT F32A Fwd/FlgT F32A Rev” y “FlgT F315A Fwd/FlgT F315A Rev”, respectivamente (Tabla 3). Los productos de PCR se transformaron directamente en la cepa TOP10 (Tabla 1), se seleccionaron las clonas recombinantes, se purificaron los plásmidos y se verificaron las mutaciones mediante secuenciación. En el caso del plásmido pTZ18R_FlgT_F32A-F315A [49] (Tabla 2) se obtuvo mediante la misma técnica, solo que usando como templado el plásmido pTZ18R_FlgT_F32A [47] (Tabla 2) y los oligonucleótidos “FlgT F315A Fwd/FlgT F315A Rev” (Tabla 3).

pRK415_FlgT_F32A, F315A y F31A-F315A.

La obtención de estos plásmidos fue mediante la utilización de los antes mencionados [47-49] (Tabla 2) que se digirieron con las enzimas XbaI y EcoRI, se purificaron los fragmentos resultantes y se clonaron en el vector pRK415 [12] (Tabla 2) previamente digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos obtenidos se transformaron en la cepa TOP10 (Tabla 1) y se seleccionaron colonias recombinantes. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [51-53] (Tabla 2) y se conjugaron con la cepa SF3 ($\Delta flgT::aadA$) (Tabla 1).

pGADT7_AD-MotF Δ 1-98_Y238A, Y238G y Y238F.

Al igual que las construcciones anteriores, estas se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR. Se utilizó como templado el plásmido pTZ18R_MotF_WT [2] (Tabla 2), el oligonucleótido “pG67FCOOH” para amplificar solo la región periplásmica de MotF

(residuos 99-239) y los oligonucleótidos reversos “MotF Y238A, Y238G y Y238F” para cada mutante correspondiente. Se purificaron los productos resultantes, se digirieron con EcoRI y se clonaron en el vector pGDAT7_AD [54] (Tabla 2) previamente digerido con la misma enzima. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa TOP10 (Tabla 1), se hicieron minipreparaciones de plásmido y mediante digestiones internas con NdeI se verificó la orientación del fragmento. Se seleccionaron clonas recombinantes, se purificaron los plásmidos y se secuenciaron para verificar las mutaciones deseadas. De esta manera se obtuvieron los plásmidos [62-64] (Tabla 2). Finalmente, los plásmidos fueron transformados mediante choque térmico en células competentes de las cepas AH109 y Y187 de *S. cerevisiae* (Tabla 1) para ensayos de doble híbrido y actividad de β -galactosidasa, respectivamente.

Ensayos de nado

Para evaluar el fenotipo de nado, se prepararon cultivos de las cepas de interés en medio SistroM líquido adicionado con los antibióticos correspondientes y se crecieron hasta fase exponencial (OD_{600}). Se prepararon cajas de medio SistroM adicionadas con agar al 0.2%, se inocularon con 1.5 μ L de los cultivos en cuestión, y las cajas se incubaron en oscuridad a 30°C por 48 hrs. La cuantificación de los halos de nado se realizó en el programa IMAGEJ con la medición en cm^2 de 20 halos por cepa y se graficó en porcentaje con respecto a WS8. Se realizaron pruebas T de Student de muestras independientes de dos colas ($P < 0.05$).

Ensayos de inmunodetección (Western blot)

Se tomaron alícuotas de 1 mL a partir de cultivos crecidos a DO 0.6 de las diferentes cepas utilizadas, fueron centrifugadas a 13,000 rpm, se decantó el medio y se resuspendió la pastilla celular en 100 μ L de amortiguador de PBS y las muestras se sometieron a sonicación con una sonda de ultrasonidos con 3 pulsos de 10 segundos cada uno. (Se tomaron 5 μ L de cada una de las muestras para cuantificar la cantidad de proteína mediante la técnica de Bradford). Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 50 μ L de amortiguador de Laemmli 4X adicionado con β -mercaptoetanol, y se hirvieron durante 5 min.

Las muestras se ajustaron a 10 µg (anti-MotF y anti-FlgT) y 12-18 µg (anti-MotB) de proteína, se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12% a una corriente de 20 mA y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 250 mA. Posteriormente, la membrana se bloqueó por una hora en una solución de leche en polvo al 3% disuelta en TBS-Tween (Tris 50mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%, a pH 8). Al acabar el bloqueo, la membrana se lavó cada 15 minutos tres veces con TBS-Tween y se incubó con los anticuerpos primarios policlonales de ratón correspondientes, anti-MotF (1:6,666 x 1.5hrs), anti-FlgT (1:3000 x 1.5hrs) y anti-MotB (1:2500 x 2hrs) en una solución de 10 mL de TBS-Tween adicionada con 0.5% de leche.

Al terminar la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó de nuevo cada 15 minutos tres veces con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón en una solución de 10 ml de TBS-T a una dilución 1:20,000 durante una hora. Se realizaron nuevamente tres lavados de 15 minutos y finalmente la membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato CDP-Star y se reveló la reacción de quimioluminiscencia utilizando placas fotográficas.

Evaluación de fluorescencia *in vivo*

Para evaluar la señal fluorescente de la proteína GFP, se tomaron alícuotas de cultivos en fase exponencial de las diferentes cepas utilizadas y se colocaron en un portaobjetos cubierto con una capa de agarosa al 1% disuelta en medio Sistrom. Se tomaron fotografías de epifluorescencia utilizando el objetivo 100x de un microscopio Nikon Eclipse 600 equipado con una cámara Hammamatsu Orca-ER, con parámetros de 250 ms y 2500 ms de exposición para la fase y la fluorescencia, respetivamente. Los puntos de fluorescencia se cuantificaron en 200-250 células por cepa en el programa IMAGEJ.

Ensayo de doble-híbrido

Los ensayos fueron realizados siguiendo el protocolo “Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3” del fabricante (Clontech). En resumen, células competentes de *S. cerevisiae* en la cepa AH109 y Y187 fueron cotransformadas mediante choque térmico con los pares de plásmidos; pGADT7_AntT[56]/pGBKT7_p53[57], pGADT7_AntT[56]/pGBKT7_Lam[58], pGADT7_FlgT[59]/pGBKT7-BD-FlgT[60] y pGBKT7-BD-FlgT[60]/pGADT7_AD-MotFΔ1-98_WT, Y288A, Y238G, Y238F[61-64], respectivamente. Los plásmidos [61-64] expresan la fusión entre el dominio de activación de Gal4 (AD) y la región periplásmica de MotF entre los residuos 99 y 239 con la respectiva mutación en el residuo 238, mientras que el plásmido [60] expresa la versión completa de FlgT fusionada al dominio de unión a DNA de Gal4 (BD).

Las dobles transformantes se seleccionaron como protótrofos de triptófano (Trp) y leucina (Leu), y se cultivaron durante toda la noche en medio mínimo SD sin Leu y Trp (-LT) pero adicionado con histidina (His) y adenina (Ade). Se tomaron alícuotas de 1mL de los cultivos y se lavaron una vez con medio SD sin suplementos, se normalizaron a una DO de 0.6 e inmediatamente se realizaron cuatro diluciones en serie 1:10. A partir de estas diluciones, se sembraron alícuotas de 10 µL en placas de selección de medio SD -LT, -LTH y -LTHA, y se incubaron a 30°C durante 11 días.

Ensayo de β-galactosidasa

Los ensayos fueron realizados siguiendo el protocolo “Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3” del fabricante (Clontech) con algunas modificaciones. En resumen, se utilizaron los mismos pares de plásmidos antes mencionados y se cotransformaron en la cepa de *S. cerevisiae* Y187 mediante choque térmico.

Las dobles transformantes se seleccionaron en medio sólido SD -LT, se cultivaron durante toda la noche a 30°C en medio líquido SD -LT y se tomaron alícuotas de 3 mL. Las muestras

se centrifugaron, se decantó el medio y las pastillas celulares se resuspendieron en 200 μ L de buffer de lisis (90% agua bidestilada, 10% HEPES 10x y 0.1% Tritón 100x). Las células se lisaron mediante dos ciclos de congelación/descongelación en hielo seco y a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno. Se tomaron 50 μ L del extracto celular, se añadieron 100 μ L de buffer de ensayo (200 mM de fosfato monobásico de potasio, 2 mM de cloruro de magnesio y 100 mM de β -mercaptoetanol a pH 7.5), adicionado con 0.5% de 4-methylumbelliferil- β -D-Galactopiranosido (11.4 mg/ml disuelto en DMSO) (Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C por tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos. Finalmente, las reacciones se detuvieron con 2 mL de una solución de carbonato de calcio a 200mM.

Las actividades enzimáticas se midieron en un fluorómetro "AMINCO-Bowman Series2" (excitación a 360 nm y emisión a 449 nm) calibrado con una curva estándar de 4-metilumbeliferona (MU) (Sigma-Aldrich). La actividad se expresó como picomoles de MU por minuto por miligramo de proteína. La concentración de proteínas se determinó con un estuche de ensayo de proteínas (Bio-Rad), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Ensayo de purificación de peptidoglicano

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo reportado en (Pucciarelli *et al.*, 2003) con ligeras modificaciones. Brevemente, cultivos de las diferentes cepas de *R. sphaeroides* se crecieron toda la noche en 10 ml de medio Sis a 30°C en oscuridad con una agitación de 200 rpm. Posteriormente, todo el cultivo se reinoculó en 200 ml de medio Sis, las células fueron recolectadas a OD₇₀₀ por centrifugación a 8,000 rpm durante 15 min y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de PBS frío. A continuación, las células fueron goteadas lentamente en 10 ml de SDS al 8% hirviendo sobre una parrilla con agitación durante 30 min, ajustando el volumen con agua bidestilada estéril cada 10 min, seguido por un periodo de agitación de 30 min a temperatura ambiente.

El peptidoglicano macromolecular fue recuperado por ultracentrifugación a 30,000 rpm durante 30 min, el sobrenadante fue decantado cuidadosamente y el peptidoglicano fue resuspendido en 500 μ l de PBS. De los cuales, se tomaron 10 μ l para ajustar las muestras por cantidad de proteína mediante un ensayo de Bradford, y se mezclaron 100 μ l en amortiguador de Laemmli para analizar las muestras mediante Western Blot (anti-MotB).

Análisis bioinformáticos

Se realizaron búsquedas en BLAST utilizando como consultas las secuencias de aminoácidos de MotF y FlgT, y se seleccionaron las opciones de BLAST-P (FlgT) y PSI-BLAST (MotF). En el caso de la opción PSI_BLAST, se seleccionaron las secuencias pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae y con ellas se generó una matriz por cada iteración (4 en total). Para ambas opciones se descargaron las secuencias homólogas con un criterio de selección de E-value >0.005 y porcentaje de similitud $>30\%$, se realizaron alineamientos en MUSCLE y se visualizaron en JALVIEW.

Análisis filogenéticos

Para estos análisis se siguió la metodología reportada en un estudio previo (Poggio *et al.*, 2007) con ligeras modificaciones. Brevemente, la búsqueda de homólogos se realizó con BLAST-P utilizando como consultas las secuencias de *R. sphaeroides* de FlhA, FlhB, FliG, FliF y FliP para el árbol flagelar, y UvrA, FtsH, NusA, DnaB, RplC, RplF, Lgt y ClpP para el árbol de referencia, utilizando como criterios de selección; E-value >0.005 , superposición $>50\%$ y porcentaje de similitud $>30\%$. Se realizaron alineamientos múltiples con MUSCLE y se concatenaron con el programa MEZQUITE. La supermatriz obtenida se utilizó para realizar la búsqueda de árboles finales en PHYML utilizando el criterio de información Akaike, se generaron 100 árboles de parsimonia máxima de adición escalonada aleatoria generados con PAUP, y la búsqueda de árboles finales se generó con NJBio.

Resultados

Análisis de la interacción FlgT-MotF

Ensayo de doble-híbrido

Como anteriormente se mencionó, la tirosina 238 es indispensable para que MotF pueda ser incorporada a la base del flagelo, en donde su localización podría ser dependiente de la interacción con FlgT. Por tal motivo, se decidió probar si versiones mutantes en el residuo 238 de MotF son capaces de interactuar con FlgT mediante un ensayo de doble híbrido en levadura.

Para este experimento, se probó la interacción entre la región periplásmica de MotF que carece de la región adyacente al cruce transmembranal (MotF Δ 1-98) con las mutaciones en el residuo 238 (Y238A, Y238G y Y238F) y la versión completa silvestre de FlgT. Dichas versiones de MotF fueron fusionadas al dominio de activación del factor transcripcional de levaduras Gal4 (AD), mientras que FlgT fue fusionada al dominio de unión a DNA (BD).

Los plásmidos que expresan ambas proteínas de fusión fueron co-transformados en la cepa de *S. cerevisiae* AH109, en la cual los genes reporteros *HIS3* y *ADE2* se encuentran bajo el control positivo de Gal4. De manera que, ante una interacción positiva entre las proteínas de interés (MotF y FlgT), acercaría espacialmente los dominios de unión (BD) y activación (AD) de Gal4, permitiendo así la transcripción de los genes *HIS3* y *ADE2*, lo que promueve (basado en la fuerza de interacción) el crecimiento de las levaduras en ausencia de histidina y/o adenina.

En el trabajo realizado por Fabela (2013), se demostró que la cepa AH109 expresando las fusiones AD-MotF Δ 1-98_WT y BD-FlgT_WT (WT) es capaz de crecer en ausencia de histidina después de 10 días de incubación a 30°C, indicando la interacción entre FlgT y la región periplásmica de MotF. En este trabajo, se utilizó dicha cepa como control positivo para determinar si las sustituciones en la tirosina 238 de MotF abolen, mantienen o aumentan la capacidad de interacción entre MotF y FlgT.

Como resultado de este ensayo, se comprobó que la cepa con la construcción control (WT) crece en ausencia de histidina y que, además, es capaz de crecer en ausencia de histidina y adenina después de 11 días. Por otra parte, la cepa obtenida en este trabajo expresando las fusiones AD-MotF Δ 1-98_Y238A/BD-FlgT_WT fue capaz de crecer en ausencia de histidina. Sin embargo, mostró una reducción en el crecimiento en ausencia de histidina y adenina en comparación con la cepa control (WT), lo cual sugiere que la tirosina 238 de MotF contribuye a la interacción con FlgT (Figura 15).

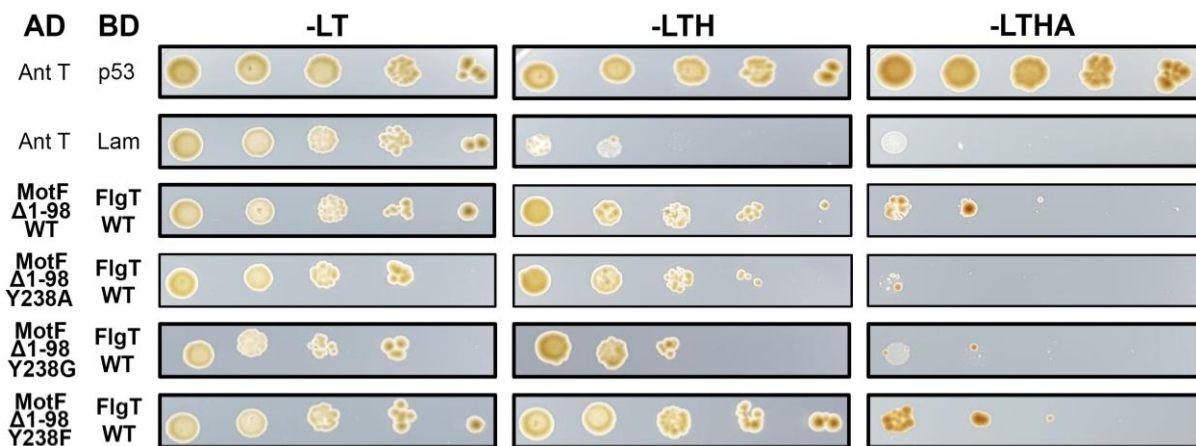


Figura 15: Ensayo de doble híbrido. Células de *S. cerevisiae* de la cepa AH109 fueron co-trasformadas con los plásmidos indicados a la izquierda. Los pares AD-AntT/BD-p53 AD-AntT/BD-Lam son los controles positivo y negativo, respectivamente. Se inocularon diluciones seriales 1:10 (izquierda a derecha) a partir de cultivos de las células transformadas en cajas con el medio de crecimiento indicado en la parte superior; medio sintético (SD) sin Leucina y Triptófano (-LT), sin los dos anteriores e Histidina (-LTH) y sin los tres anteriores y adenina (-LTHA). Las fotos se tomaron después de 11 días de incubación a 30°C.

Con el fin de observar correlación entre estos resultados y los diversos ensayos de nado/localización con las mutantes de la tirosina 238 de MotF presentados en el trabajo de Rodríguez-Méndez (2018), se decidió probar la interacción entre las mutantes de MotF (Y238G y Y238F) y FlgT mediante doble híbrido.

Para ello, se obtuvieron las fusiones AD-MotF Δ 1-98_Y238G y AD-MotF Δ 1-98_Y238F, que fueron co-expresadas cada una junto con la fusión BD-FlgT_WT en la cepa AH109. Como resultado de este experimento, se observó que ambas cepas, fueron capaces de crecer en ausencia de histidina. Sin embargo, al observar el crecimiento de estas cepas en ausencia de histidina y adenina, se observa que la primera cepa (Y238G) muestra una reducción en la capacidad de crecimiento similar a la cepa (Y238A), mientras que la segunda cepa (Y238F) sí es capaz de crecer de manera semejante a la cepa control (WT) (Figura 15).

Estos resultados indican de manera cualitativa que MotF requiere de un residuo aromático (Y y F) en la posición 238 para favorecer la interacción con FlgT. Por lo tanto, para valorar estas diferencias de manera cuantitativa, se decidió hacer un ensayo adicional de interacción usando como reportero la actividad de β -galactosidasa en levaduras.

Ensayo de la actividad de β -galactosidasa

Para este ensayo se utilizaron los mismos plásmidos que llevan las fusiones AD-MotF Δ 1-98_Y238A, Y238G, Y238F y BD-FlgT_WT, los cuales fueron co-expresados en la cepa de *S. cerevisiae* Y187, en la cual el gen reportero *lacZ* se encuentra bajo el control positivo de Gal4. Este ensayo sigue el mismo fundamento que el ensayo de doble-híbrido, en donde una interacción positiva entre las proteínas de interés promueve la transcripción del gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, cuya actividad se puede cuantificar en presencia de su sustrato como una medida indirecta de la fuerza de interacción.

En este ensayo se utilizaron como controles las cepas Y187 que co-expresan las fusiones AD-AntT/BD-p53 (control positivo), AD-AntT/BD-Lam (control negativo) y AD-FlgT/BD-FlgT (control positivo). En el trabajo realizado por Fabela (2013), se demostró mediante doble-híbrido que FlgT es capaz de interactuar fuertemente consigo misma; sin embargo, dicha interacción no se cuantificó. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten corroborar dicha interacción, ya que la cepa que expresa las fusiones AD-FlgT/BD-FlgT tiene mayor actividad enzimática que la cepa que expresa las fusiones AD-AntT/BD-Lam (control negativo) (Figura 16).

En el caso de las cepas que co-expresan las fusiones AD-MotF Δ 1-98_WT, Y238A, Y238G, Y238F/BD-FlgT_WT, se observaron niveles muy bajos de la actividad de la β -galactosidasa similares entre todas las cepas, y semejantes al nivel observado con las fusiones AD-AntT/BD-Lam (control negativo) (Figura 16). Estos resultados indican que no existe diferencia alguna entre la interacción de FlgT y la diferentes versiones (mutantes y silvestre) de MotF, o el ensayo cuantitativamente no tiene la sensibilidad para detectar dichas interacciones.

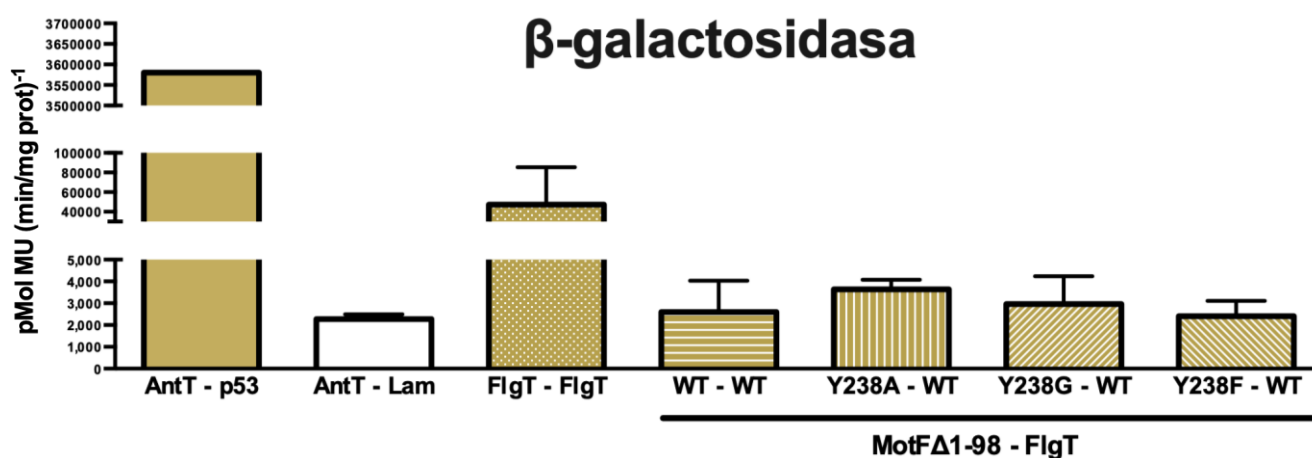


Figura 16: Ensayo de β -galactosidasa. Actividades de la β -galactosidasa en la cepa Y187 de *S. cerevisiae* a partir de las interacciones entre las diferentes fusiones indicadas en la parte inferior de la gráfica. La actividad es reportada como picomoles de MU por minuto por miligramo de proteína. La gráfica anterior corresponde a un único ensayo a partir de tres transformantes diferentes de cada cepa.

Predicción del sitio de unión en FlgT

En el trabajo realizado por Terashima (2013) se obtuvo la estructura cristalográfica de FlgT de *Vibrio alginolyticus* en donde se caracterizaron los dominios amino, medio y carboxilo, los cuales son delimitados por dos cisteínas conservadas que estabilizan los dominios mediante un puente disulfuro. En dicho trabajo se menciona la presencia de una horquilla- β presente en el dominio carboxilo, y que esta estructura es fijada y estabilizada con el dominio amino mediante dos apilamientos de anillos aromáticos. Uno de ellos entre la F56 y el W326, y el segundo entre el W25 y la F326, los cuales se encuentran a una distancia de 4.3 y 5.7 Å, respectivamente (Figura 17A).

Con base en estos antecedentes, se decidió analizar si dichos apilamientos pudieran estar presentes en FlgT de *R. sphaeroides*. Para ello, se realizaron dos modelajes en los servidores de I-TASSER y ExpASy utilizando como templado el cristal de FlgT de *V. alginolyticus*. Como resultado de esta aproximación, se observó que en el modelaje generado por ExpASy, FlgT de *R. sphaeroides* no presenta la misma horquilla- β en el dominio carboxilo. Además, el programa no realizó el modelaje de los últimos 20 residuos, región en la cual se encuentran dos aminoácidos aromáticos (Datos no mostrados).

Por otra parte, el modelaje realizado por el servidor I-TASSER arrojó una estructura completa conteniendo los últimos 20 aminoácidos que no se modelaron en ExpASy. Interesantemente, en este modelaje sí se observa la presencia de una horquilla- β en el dominio carboxilo de FlgT de *R. sphaeroides* (Figura 17B).

En dicha horquilla está presente la fenilalanina 315, la cual se encuentra orientada hacia el dominio amino en donde se encuentra otro residuo aromático que es la fenilalanina 32, de manera tal que en el modelaje realizado por I-TASSER estos dos residuos se encuentran orientados espacialmente. Sin embargo, se encuentran separados a ≈ 8.4 Å, distancia mayor a la observada en FlgT de *V. alginolyticus*, por lo que se encontrarían muy distantes uno del otro como para formar un apilamiento entre anillos aromáticos (Figura 17B).

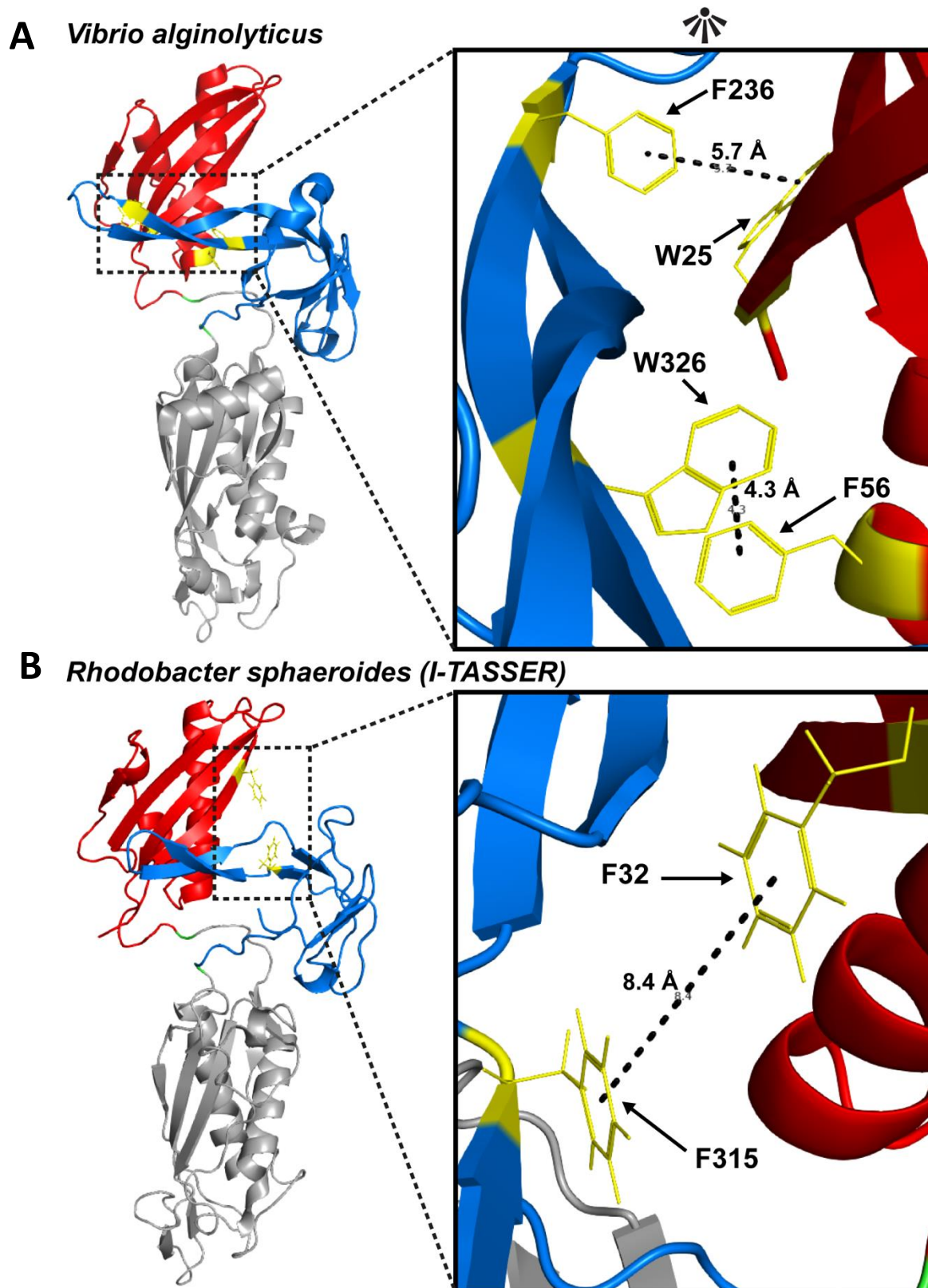


Figura 17: Estructura terciaria de FlgT. **A-** Se muestra del lado izquierdo la visualización tridimensional generada a partir de la estructura cristalográfica de FlgT en *V. alginolyticus*. En el lado derecho, se muestra un acercamiento y medición de distancias entre aminoácidos aromáticos en los dominios amino y carboxilo. **B-** En el lado izquierdo se muestra el modelaje de FlgT de *R. sphaeroides* obtenido en el programa I-TASSER. En la derecha se muestra un acercamiento y medición de distancia entre la F32 y la F315. (En rojo se muestra el domino amino, en gris el domino medio y en azul el carboxilo)

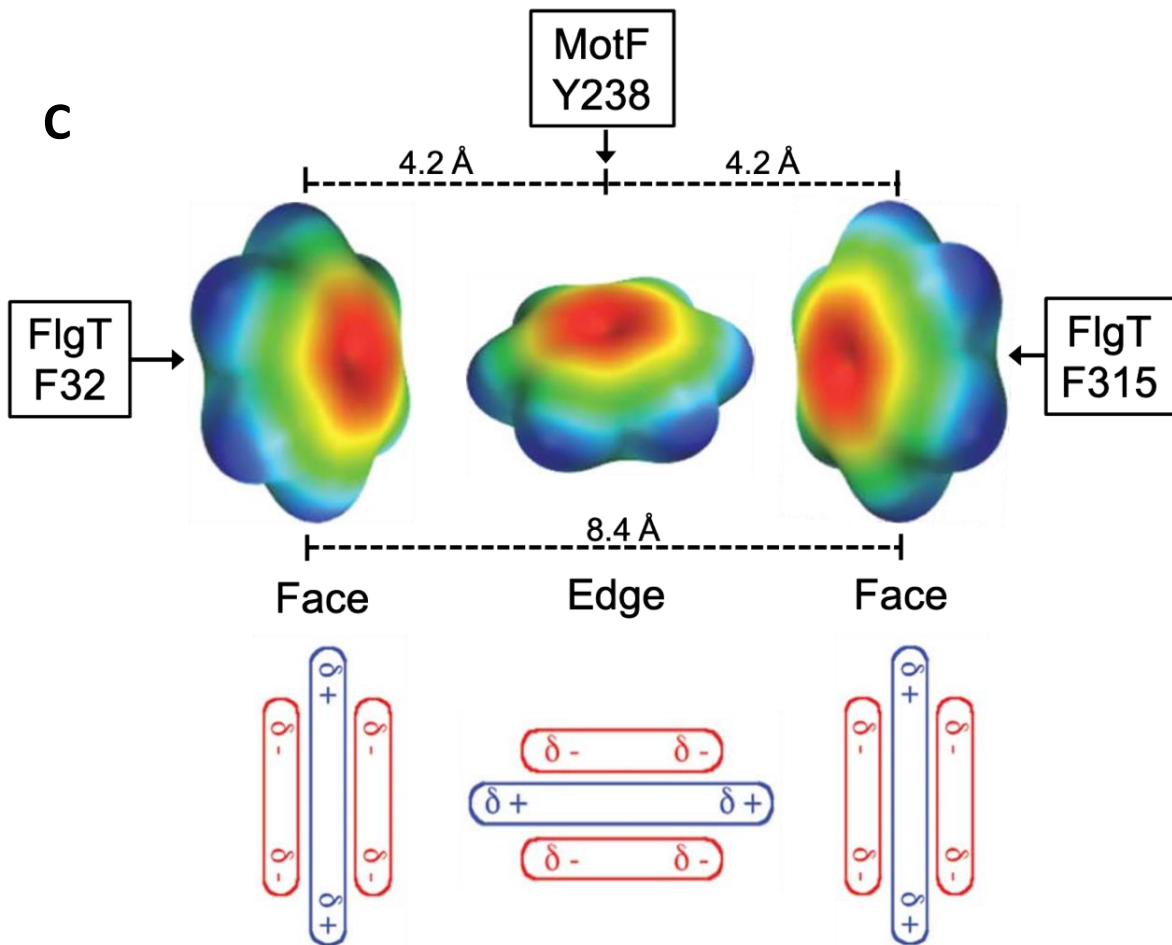


Figura 17C: Modelo de interacción MotF-FlgT. Esquema ilustrando la posible interacción entre los aminoácidos aromáticos en FlgT (F32 y F315) y MotF (Y238).

Con base en estas observaciones, hemos hipotetizado que la proteína MotF, la cual no se encuentra en la familia Vibrionaceae (Rodríguez-Méndez, 2018), podría estar involucrada en la interacción entre los dominios amino y carboxilo de FlgT. Es posible que la Y238 de MotF pudiera coordinar la interacción entre la F32 y la F315 de FlgT, acortando la distancia entre ellos de ≈ 8.4 a ≈ 4.2 Å, posicionando a la Y238 de MotF justo en medio de los residuos aromáticos de FlgT, permitiendo así una interacción estable entre anillos aromáticos de tipo Face-Edge-Face (F32-Y238-F315) (Figura 17C).

Con el fin de apoyar la hipótesis anterior, se realizó un alineamiento entre proteínas homólogas a FlgT en especies de la familia Rhodobacteraceae. Como resultado de este análisis, se observó que los residuos F32 y F315 se encuentran medianamente conservados, siendo la F315 el residuo más conservado de los dos (Figura 18).

En la secuencia primaria de FlgT se encuentran 12 aminoácidos aromáticos, 2 de ellos en el dominio amino, 7 en el medio y 3 en el carboxilo. En el dominio amino, la F32 presenta el menor grado de conservación, y el W103 es el residuo más conservado. En el dominio carboxilo, los más conservados son la F315 y la F356. Mientras que, en el dominio medio, el W142 y la Y186 presentan el mayor grado de conservación de entre todos los anteriores (Figura 18).

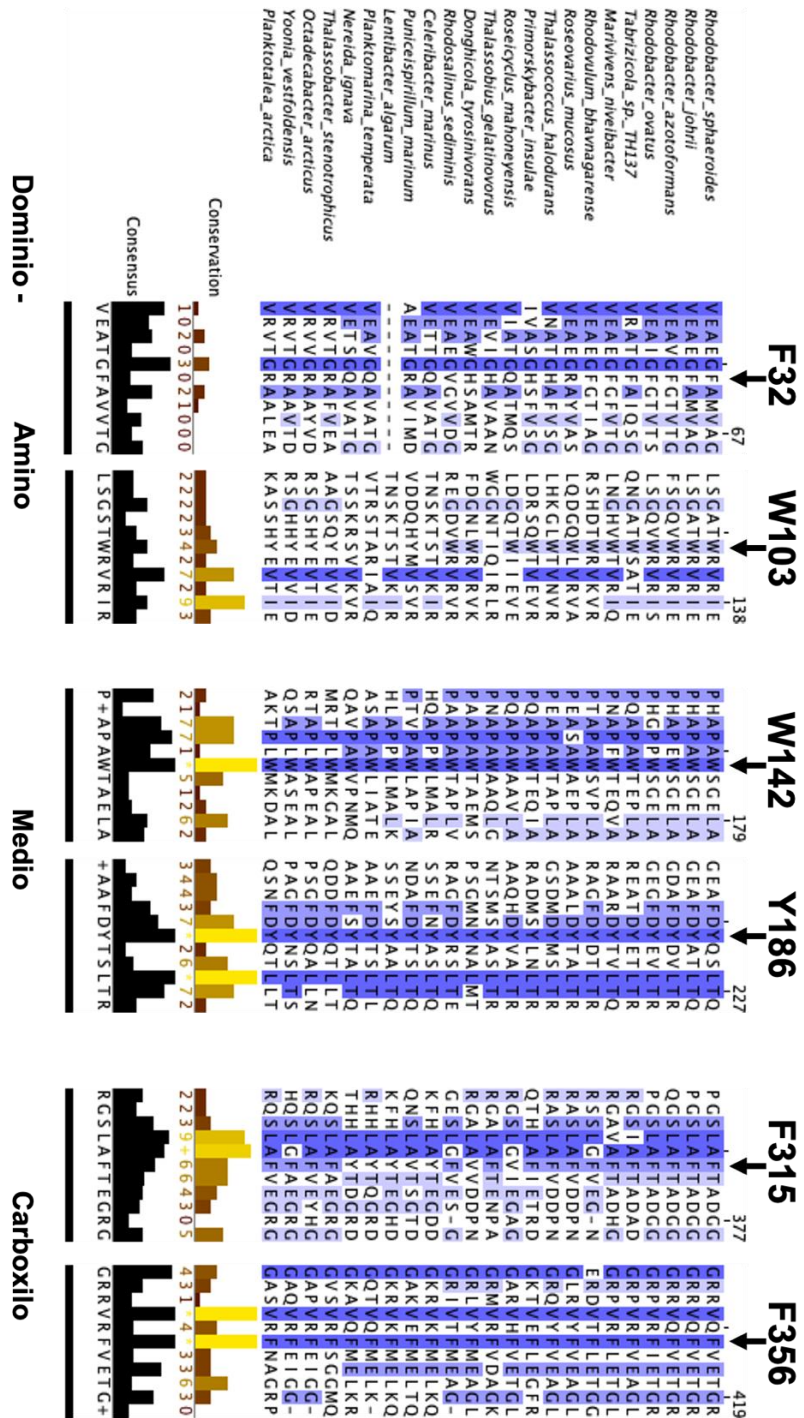


Figura 18: Alineamiento de homólogos a FlgT. Alineamiento múltiple generado a partir de secuencias homólogas a FlgT en 23 especies diferentes de la familia Rhodobacteraceae. Se muestran fragmentos del alineamiento completo para ilustrar los residuos aromáticos más conservados en los tres dominios de FlgT.

Mutaciones en la F32 y la F315 de FlgT

Se decidió generar tres versiones mutantes de FlgT: F32A, F315A y F32A-F315A. Se obtuvieron las cepas transformadas con los plásmidos que codifican dichas versiones (SF3/pRK415_FlgT_F32A, SF3/pRK415_FlgT_F315A y SF3/pRK415_FlgT_F32A-F315A), y se analizó el fenotipo de nado en cajas de agar suave, así como la detección de FlgT mediante un ensayo de Western blot.

Se utilizó como control negativo la cepa mutante SF3 ($\Delta flgT::aadA$) y como controles positivos la cepa parental WS8, la cepa complementada SF3/pRK415_FlgT_WT y la cepa SF3/pRK415_FlgT_ΔC. Esta última expresa una versión trunca de FlgT que carece de todo el dominio carboxilo, dicha cepa es capaz de nadar y restablecer el nado de la cepa SF3 parcialmente, a pesar de que la proteína trunca no puede ser detectada mediante Western blot (Figura 19B).

Como se observa en la figura 19A, los tres alelos mutantes de FlgT F32A, F315A y F32A-F315A son capaces de restituir el nado de la cepa SF3 de manera parcial. Ya que se observa que el halo formado por estas cepas es significativamente menor en comparación con la cepa complementada (Figura 19C). Cabe mencionar, que los halos de estas tres cepas son de un tamaño similar al formado por la cepa que expresa la versión trunca ΔC. Lo que indica que mutaciones sencillas en estos residuos aromáticos, tienen un efecto similar a no tener por completo el dominio carboxilo, revelando la importancia de estos.

Para comprobar la presencia de las versiones mutantes de FlgT en las cepas generadas, se realizó un ensayo de Western blot en el que se detectó la proteína a niveles similares que en la cepa parental WS8, la cepa complementada y la cepa que expresa FlgT con la mutación F32A. Sin embargo, no hubo detección de FlgT en las cepas que expresan las versiones F315A y F32A-F315A (Figura 19B), lo que indica que se requiere particularmente de la fenilalanina 315 para la estabilidad de FlgT, especialmente del dominio carboxilo.

Los resultados obtenidos (Figura 19) descartan la hipótesis planteada, porque indican que los aminoácidos aromáticos F32 y F315A de FlgT no interactúan con MotF. Ya que, de ser esenciales para la interacción, se esperaría que la cepa que expresa la versión mutante F32A-F315A no fuera capaz de nadar, y como se puede observar, sí lo hace.

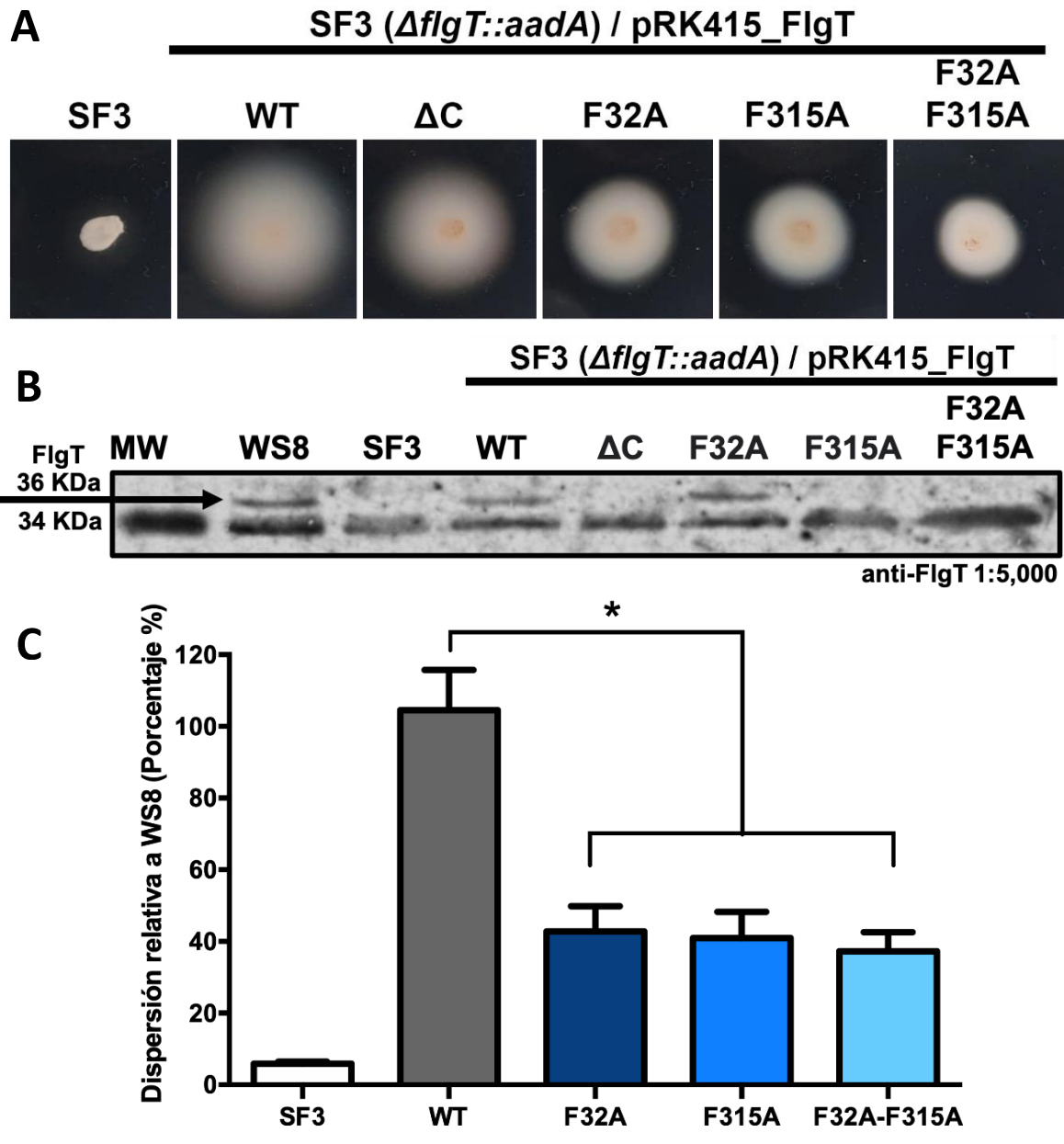


Figura 19: Mutantes de FlgT. A- Halos de nado. B- Western blot anti-FlgT. C- Cuantificación de halos. Para estos ensayos se utilizaron las cepas WS8, SF3 ($\Delta flgT::aadA$), SF3/pRK415_FlgT_(ΔC , WT, F32A, F315A y F32-F315A) *($P < 0.05$).

Mutaciones en la Y238 de MotF

Debido a que nuestra hipótesis sobre la interacción MotF-FlgT mediante apilamiento de anillos aromáticos fue descartada, decidimos analizar si diferentes tipos de aminoácidos tienen algún efecto en el nado, similar o contrario al papel que tiene la tirosina 238 de MotF.

Para ello, se obtuvieron cepas que expresan versiones de MotF con mutaciones puntuales en la Y238 por otros tipos de aminoácidos, como los que tienen carga positiva (Histidina, Lisina y Arginina), carga negativa (Ácido aspártico y Ácido glutámico), apolares (Leucina e Isoleucina) y polares sin carga (Serina y Treonina).

Los alelos mutantes se clonaron en el vector de expresión pRK415, se conjugaron en la cepa VR1 ($\Delta motF::aadA$), se analizó el fenotipo de nado y se realizaron ensayos de Western blot. Como resultado de estos experimentos, se observó que las mutantes en el residuo 238 por aminoácidos con carga negativa (Y238D y Y238E) y polares sin carga (Y238S y Y238T) no restablecieron la capacidad de nado de la cepa VR1 (Figura 20A').

Sorpresivamente, las mutantes por aminoácidos con carga positiva (Y238H, Y238R y Y238K) y apolares (Y238L y Y238I) sí restablecieron el nado de la cepa VR1, pero de manera parcial (Figura 20A y A'). Cabe mencionar, que a pesar de que estas versiones son funcionales, existe una diferencia significativa en el tamaño de los halos en comparación con la versión silvestre (Figura 20C).

Para verificar que los fenotipos de nado observados son efecto de las mutaciones generadas y no debidas a un defecto en la expresión o estabilidad de la proteína, se realizaron ensayos de Western blot en donde se detecta MotF para todas las versiones mutantes a niveles similares a los de la cepa complementada que expresa la proteína silvestre y la cepa parental WS8 (Figura 20B y B').

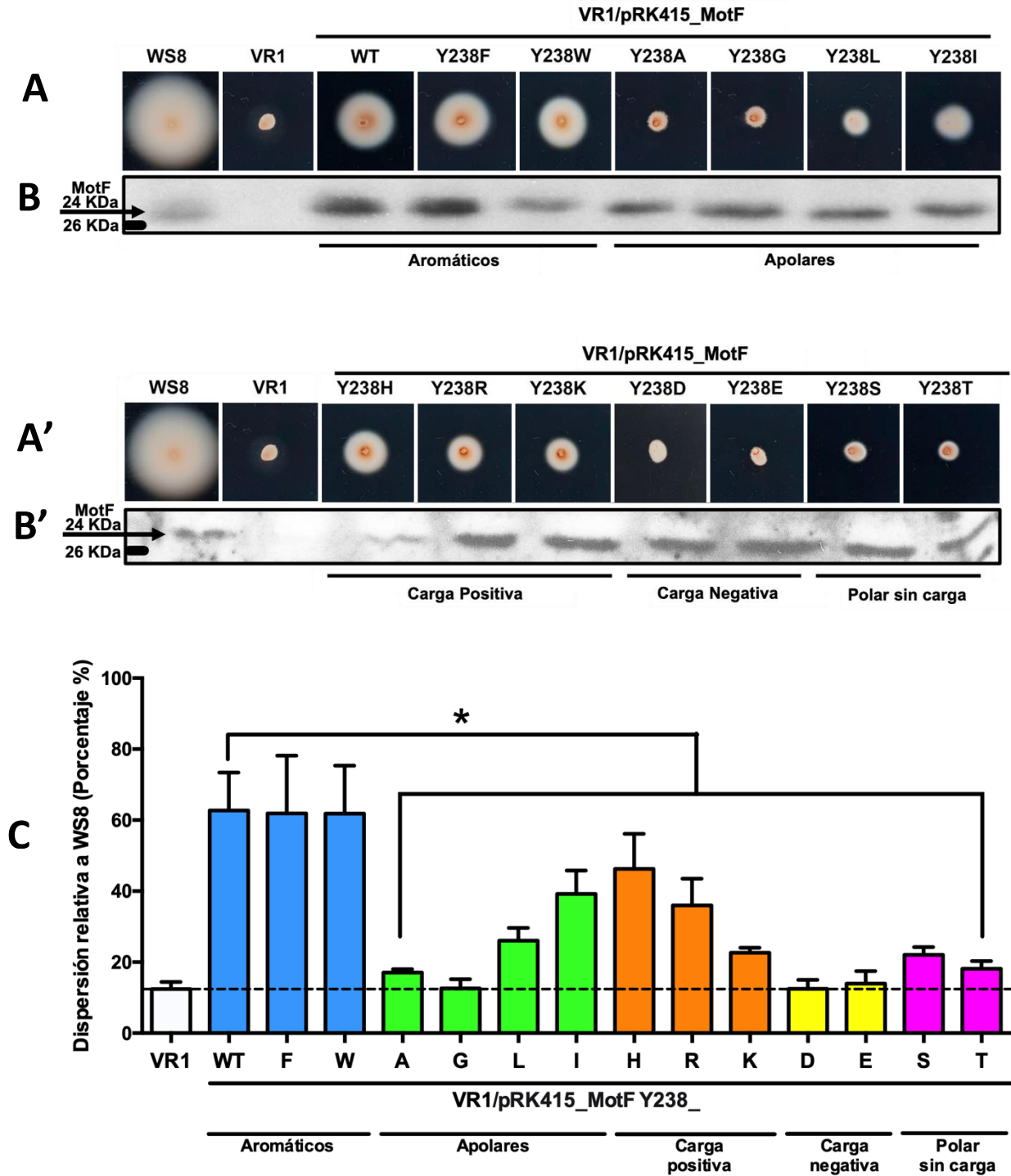


Figura 20: Mutantes de MotF. A y A'- Halos de nado. **B y B'**- Western blot anti-MotF. **C**- Cuantificación de halos. Para estos ensayos se utilizaron las cepas WS8, VR1 ($\Delta motF::aadA$), VR1/pRK415_MotF (WT, Y238F, Y238W, Y238A, Y238G, Y238L, Y238I, Y238H, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y239T) *($P < 0.05$).

Por estudios previos, se sabe que MotF realiza su función únicamente cuando la proteína es reclutada a la base del flagelo. Para analizar el efecto de las diferentes mutaciones en MotF en su localización, se obtuvieron fusiones con la proteína GFP. Los plásmidos derivados conteniendo las diferentes fusiones se conjugaron en la cepa VR1 ($\Delta motF::aadA$) y su localización se analizó por microscopías de epifluorescencia.

En estos ensayos se observó que para las mutantes que restablecen el nado (WT, Y238F, Y238W, Y238L, Y238I, Y238H, Y238R y Y238K) hay un mayor número de células con al menos un punto de fluorescencia (89%, 69%, 67%, 12%, 28%, 44%, 26% y 23% respectivamente), a diferencia de las mutantes que no restauran el nado (Y238A, Y238G, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T) que muestran menos células con punto de fluorescencia (8%, 10%, 4%, 11%, 14% y 6% respectivamente) (Figura 21).

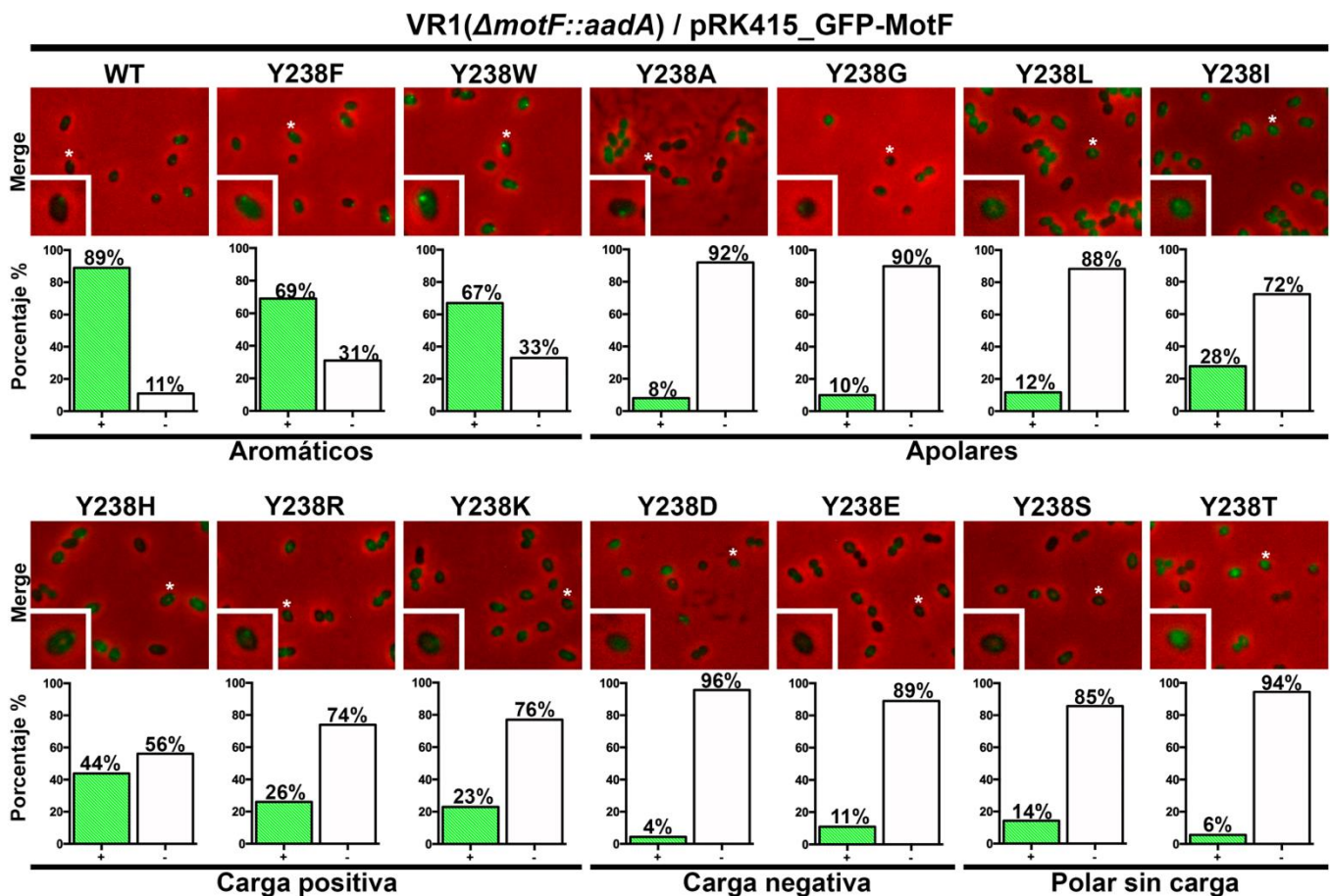


Figura 21: Microscopías de epifluorescencia. Se muestran campos representativos de las cepas VR1/pRK415_GFP-MotF_(WT, Y238F, Y238W, Y238A, Y238G, Y238L, Y238I, Y238H, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y238T). En la esquina inferior izquierda de cada imagen se muestra la célula señalada con (*). En la parte inferior de cada imagen se muestra una gráfica ilustrando los porcentajes de células que presentan un punto de fluorescencia o más (+), o ningún punto de fluorescencia (-).

Se hicieron cajas de nado inoculadas con las cepas que expresan las fusiones y se observó que en general, todas presentan un fenotipo de nado similar al observado en las mismas versiones sin fusionar a la GFP (Figura 22A y A'). Además, todas son estables ya que se observó detección de las proteínas fusionadas mediante Western blot (Figura 22B y B').

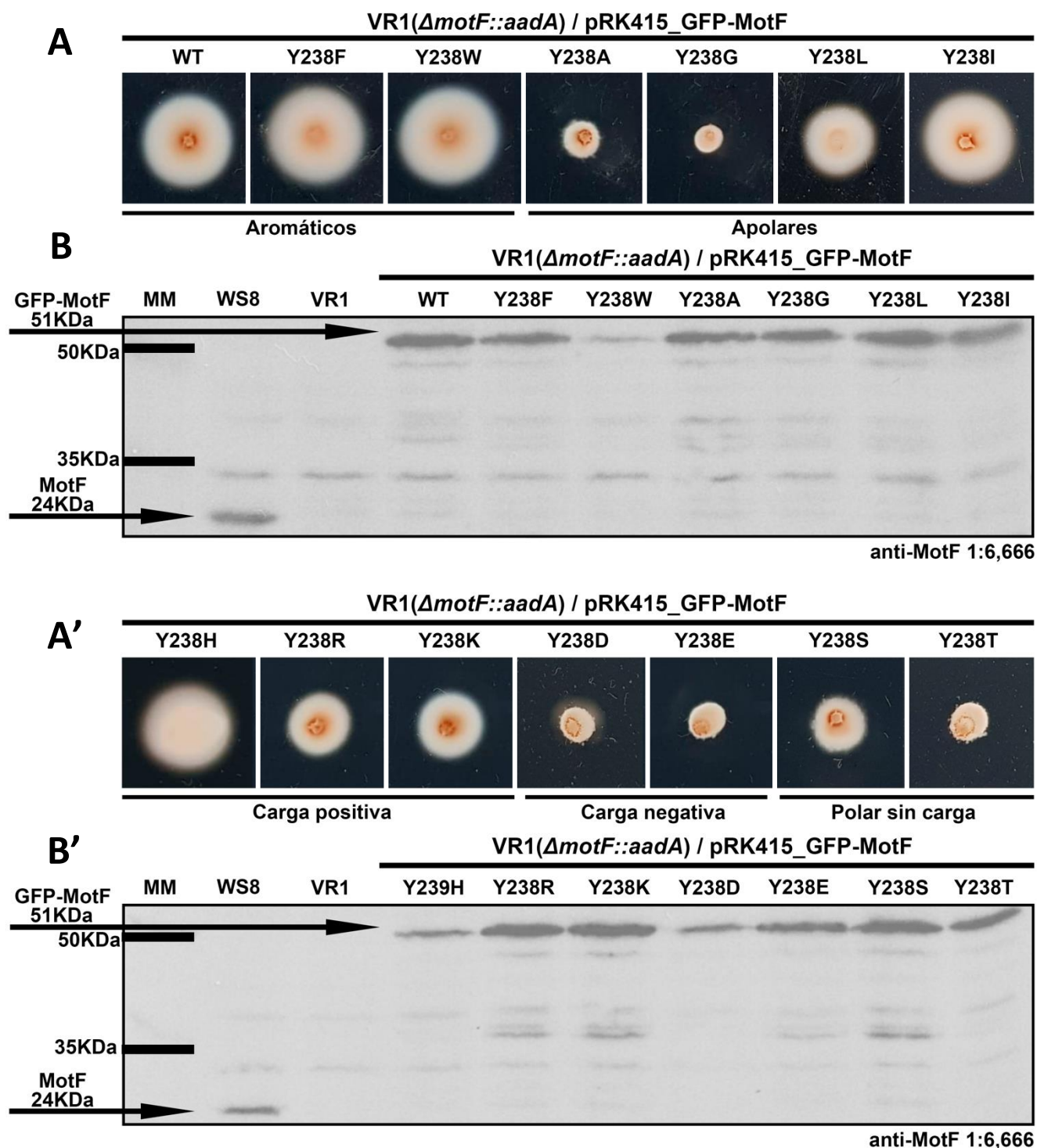


Figura 22: Fusiones GFP-MotF. A y A'- Halos de nado. **B y B'**- Western blot anti-MotF. Para estos ensayos se utilizaron las cepas WS8, VR1 y VR1/pRK415_GFP-MotF_(WT, Y238F, Y238W, Y238A, Y238G, Y238L, Y238I, Y238H, Y238R, Y238K, Y238D, Y238E, Y238S y Y239T).

Con base en los resultados anteriores, se observa que, en la mayoría de las versiones mutantes (Y238F,W,A,G,H,R,K,D,E,S y T), existe una relación directamente proporcional entre la capacidad de nado y el porcentaje de células que tienen puntos de fluorescencia, en función del aminoácido presente en la posición 238. Es decir que, a mayor número de células con puntos, mayor capacidad de nado. Y a menor cantidad de células con puntos, menor motilidad. Cabe mencionar, que dicha correlación no se aprecia en las sustituciones por aminoácidos hidrofóbicos (Y238I y L), en donde su capacidad de nado no parece depender de la localización de MotF (Figuras 20 y 21).

Dinámica de la unión de MotB con el peptidoglicano

Hasta la fecha, toda la evidencia presentada se ha enfocado en analizar patrones de localización de MotF cuando ciertos aminoácidos son reemplazados. Sin embargo, la acción de la proteína cuando ya se encuentra en la base del flagelo no ha sido explorada.

Como se mencionó en la introducción, se ha hipotetizado que MotF podría coordinar la apertura del canal de protones del complejo MotAB, ya que la ausencia de MotF es suprimida por mutaciones secundarias en el “plug” de MotB, reduciendo la hidrofobicidad del “plug” y permitiendo el paso de protones a través del canal (Ramírez-Cabrera *et al.*, 2012). Dicha supresión también ocurre en ausencia de FlgT y FliL, por lo que es posible que las tres proteínas (MotF, FlgT y FliL) estén involucradas en la remodelación de la región periplásmica de MotB para regular la apertura del canal mediante el “plug”.

Diferentes grupos con diversas evidencias han propuesto un modelo en donde la interacción entre el complejo MotAB y el rotor flagelar genera que la hélice $\alpha 1$ periplásmica de MotB sufra modificaciones estructurales. Este cambio conformacional causa la apertura del “plug” que permite el paso de protones a través del canal, extender el dominio de unión a peptidoglicano y expone los residuos importantes para el anclaje de los estatores al peptidoglicano (Andrews *et al.*, 2017 y Kojima *et al.*, 2018).

Si MotF ejerce un papel en la apertura del plug, es posible que participe en algún paso durante la activación de los estatores. Para empezar a evaluar esta posibilidad, se analizó si MotB es capaz de asociarse al peptidoglicano en diferentes fondos genéticos. Para ello se purificó peptidoglicano de las cepas WS8, FS4($\Delta motB::Kan$), VR1 ($\Delta motF::aadA$), SP13 ($\Delta fleQ::Kan$) + pRK415_MotB, FS6 ($\Delta motA::aadA$), FS3 ($\Delta fliL::aadA$) y SF3 ($\Delta flgT::aadA$), y se utilizaron las fracciones purificadas en un ensayo de Western blot para detectar la presencia o ausencia de MotB asociada al peptidoglicano.

Sorpresivamente, en este ensayo se observó señal de MotB en los fondos genéticos de las cepas VR1 ($\Delta motF$), FS3 ($\Delta fliL$), y SF3 ($\Delta flgT$), al igual que en el control positivo de la cepa parental WS8. No así en el control negativo de la cepa FS4 ($\Delta motB$), y en las cepas FS6 ($\Delta motA$) y SP13 ($\Delta fleQ$) + pRK415_MotB (Figura 23A).

Cabe destacar que en el caso de la cepa SP13 ($\Delta fleQ$) + pRK415_MotB, no hay detección de MotB en la fracción del peptidoglicano, pero sí hay en un extracto total a niveles similares al resto de las cepas (Figura 23B). Esto indica que MotB por si sola no es capaz de unirse al peptidoglicano y requiere de algún otro componente flagelar para poder anclarse.

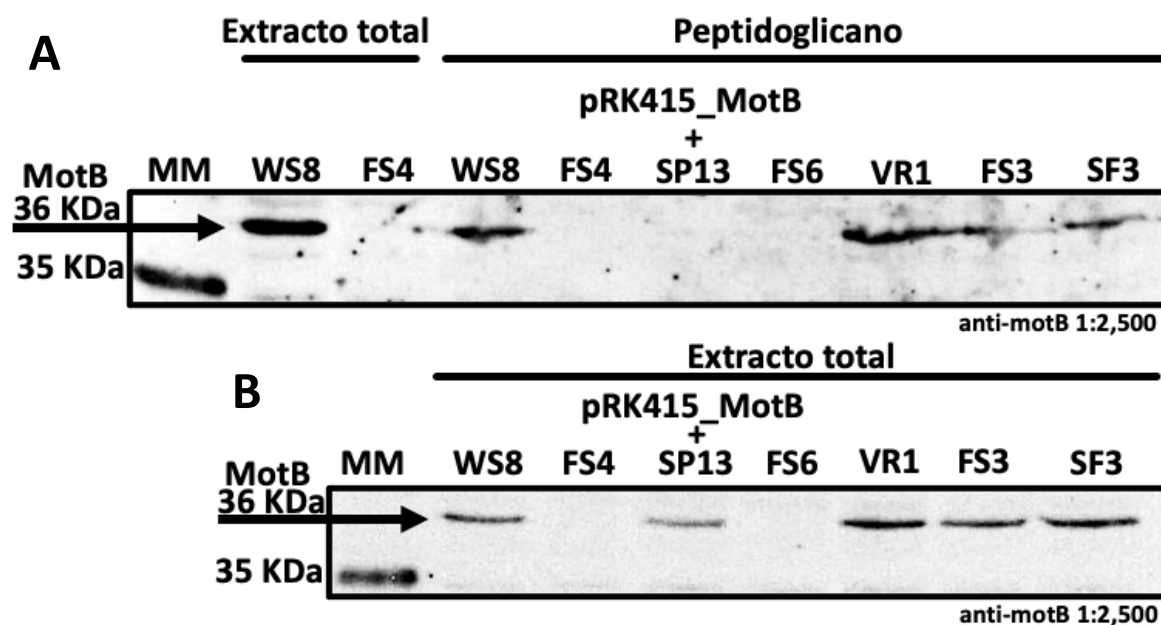


Figura 23: Unión de MotB al peptidoglicano. A- Western blot anti-MotB a partir de fracciones de peptidoglicano purificado de las cepas WS8, FS4 ($\Delta motB::Kan$), SP13 ($\Delta fleQ::Kan$) + pRK415_MotB, FS6 ($\Delta motA::aadA$), VR1 ($\Delta motF::aadA$), FS3 ($\Delta fliL::aadA$) y SF3 ($\Delta flgT::aadA$). B- Western blot anti-MotB a partir de extractos totales de las cepas antes mencionadas.

Estos resultados indican que MotB es capaz de unirse al peptidoglicano en ausencia de MotF, FliL y FlgT, y a pesar de ello las células presentan un fenotipo Mot⁻. Por lo tanto, en estos tres fondos genéticos los estatores están anclados al peptidoglicano pero no son funcionales. Esto sugiere que MotF, FliL y FlgT de manera independiente o en conjunto, están involucradas en la activación de los estatores mediante la apertura del plug.

Origen filogenético de MotF

Estudios realizados en el laboratorio demostraron que el sistema Fla1 de *R. sphaeroides* es un sistema exógeno, ya que fue adquirido en un evento de transferencia horizontal entre una α -proteobacteria y una γ -proteobacteria (Poggio *et al.*, 2007).

Análisis recientes, dirigidos a identificar la presencia de MotF en especies en donde el evento de transferencia horizontal haya ocurrido también, mostraron que el grupo de las α -proteobacterias es el único en donde se pueden encontrar homólogos, particularmente en especies pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae (Rodríguez-Méndez, 2018).

En este trabajo se realizó una nueva búsqueda de proteínas homólogas utilizando la herramienta Psi-Blast, en la cual se utilizó como consulta la secuencia primaria de aminoácidos de MotF de *R. sphaeroides* y se iteró la búsqueda 4 veces generando una matriz con los resultados obtenidos en cada iteración. Se obtuvieron 23 secuencias homólogas pertenecientes a las α -proteobacterias de la familia Rhodobacteraceae con un E-value mayor a 0.005 y un porcentaje de similitud mayor al 30%.

Estos resultados ya se habían reportado anteriormente (Rodríguez-Méndez, 2018); sin embargo, esta nueva búsqueda arrojó 3 secuencias pertenecientes a las β -proteobacterias, particularmente del género *Limnohabitans*, todas ellas cumpliendo con los criterios de selección antes mencionados (Figura 24A). Además, dichas secuencias se encuentran en un contexto flagelar, al igual que en las Rhodobacteraceae.(Figura 24 B y C).

A

Descripción	Sbjct Accession	% Identidad	E-value	% Similitud
Hypothetical protein <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	WP_002720215.1	100	4.17E-43	100
Hypothetical protein <i>Rhodobacter johrii</i>	WP_108223153.1	93.671	3.06E-43	96.2
Hypothetical protein <i>Rhodobacter azotoformans</i>	WP_108220247.1	73.878	7.15E-37	81.22
Hypothetical protein <i>Rhodobacter ovatus</i>	WP_097028991.1	56.557	6.80E-33	75.41
Hypothetical protein <i>Tabrizicola sp. TH137</i>	WP_143710431.1	33.205	1.37E-19	49.81
Hypothetical protein <i>Marivivens niveibacter</i>	WP_086449825.1	30.102	2.35E-18	54.08
Hypothetical protein <i>Donghicola tyrosinovorans</i>	WP_106266761.1	29.752	7.08E-30	51.24
Hypothetical protein <i>Primorskybacter insulae</i>	WP_108885974.1	27.049	1.20E-33	45.49
Hypothetical protein <i>Roseicyclus mahoneyensis</i>	WP_109667653.1	26.829	4.12E-18	42.68
Hypothetical protein <i>Roseovarius mucosus</i>	WP_037273814.1	26.556	3.06E-23	45.23
Hypothetical protein <i>Rhodovulum bhavnagarensis</i>	WP_132951177.1	26.016	4.80E-22	40.24
Hypothetical protein <i>Thalassococcus halodurans</i>	WP_103908512.1	24.324	4.22E-33	40.15
Hypothetical protein <i>Rhodosalinus sediminis</i>	WP_115978119.1	21.757	4.70E-19	38.49
Hypothetical protein <i>Celeribacter marinus</i>	WP_062214747.1	18.561	1.70E-23	36.36
Hypothetical protein <i>Lentibacter algarum</i>	WP_089888785.1	17.391	1.77E-24	35.18
Hypothetical protein <i>Yoonia vestfoldensis</i>	WP_007206200.1	16.822	1.41E-26	34.11
Hypothetical protein <i>Thalassobacter stenotrophicus</i>	WP_058123015.1	16.544	4.28E-22	32.35
Hypothetical protein <i>Puniceispirillum marinum</i>	WP_013045688.1	16.194	3.29E-28	37.65
Hypothetical protein <i>Thalassobius gelatinovorans</i>	WP_058264336.1	15.625	3.05E-34	37.89
Hypothetical protein <i>Octadecabacter arcticus</i>	WP_015497644.1	15.472	1.20E-38	33.96
Hypothetical protein <i>Nereida ignava</i>	WP_048599532.1	15.267	1.03E-30	34.73
Hypothetical protein <i>Planctomarina temperata</i>	WP_052377017.1	14.938	7.16E-29	35.68
Hypothetical protein <i>Planctotalea arctica</i>	WP_139816245.1	11.336	2.27E-26	29.55
Hypothetical protein <i>Limnohabitans sp. 15K</i>	WP_100173322.1	11.404	4.08E-24	33.77
Hypothetical protein <i>Limnohabitans sp. G3-2</i>	WP_100118882.1	11.304	2.53E-24	33.48
Hypothetical protein <i>Limnohabitans sp. MMS-10A-178</i>	WP_108419837.1	16	1.68E-05	33.78

α

β

3 *Limnohabitans*

Rhodobacteraceas

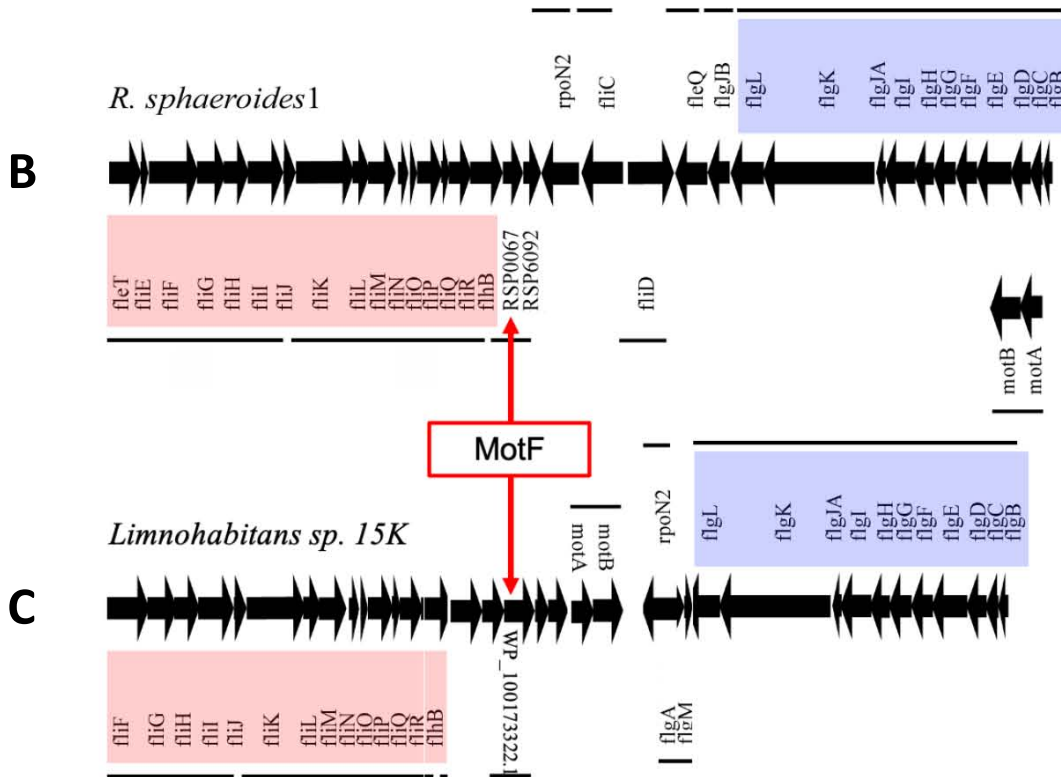


Figura 24: Psi-Blast y contexto flagelar. A- Tabla 5. Resultados de la cuarta iteración en Psi-Blast utilizando como consulta la secuencia de MotF en *R. sphaeroides* (Base de datos: nr, E-value > 0.005, Porcentaje de similitud >30%). B- Arreglo del locus flagelar I de *R. sphaeroides*. C- Arreglo del locus flagelar de *Limnohabitans sp. 15K* (Se señalan los posibles homólogos con flechas rojas).

Estas observaciones indican por primera vez la existencia de homólogos a MotF en una subclase diferente de bacterias. Estos resultados fueron sorprendentes, por lo que para confirmar estas observaciones se decidió realizar una búsqueda bidireccional. Es decir, repetir la búsqueda con los mismos criterios, solo que esta vez usando como consulta la secuencia homóloga a MotF en *Limnohabitans sp. 15K* en vez de la secuencia de *R. sphaeroides*.

Se esperaba que la búsqueda arrojara los homólogos a MotF en la familia Rhodobacteraceae; sin embargo, esto no ocurrió. En la primera entrega de resultados se obtuvieron un total de 20 secuencias pertenecientes al género *Limnohabitans* incluyendo las 3 obtenidas en la búsqueda previa. Se generó una matriz seleccionando dichas secuencias y se iteró la búsqueda, obteniendo un total de 173 secuencias con un E-value mayor al 0.005 y porcentaje de similitud mayor al 30%. Dentro de este total, se observó que 129 secuencias se encuentran anotadas en la base de datos del NCBI como: "Hypothetical protein, Methyl-accepting chemotaxis protein, HAMP-domain-containing protein, TAR-ligand-binding-domain protein, Chemotaxis protein y MCP-four helix bundle-domain protein". Representadas en un 74% por Proteobacterias (2% α , 37% β y 61% γ) (Figura 25A y B), 25% por Firmicutes y 1% por Thermotogas (Figura 25A).

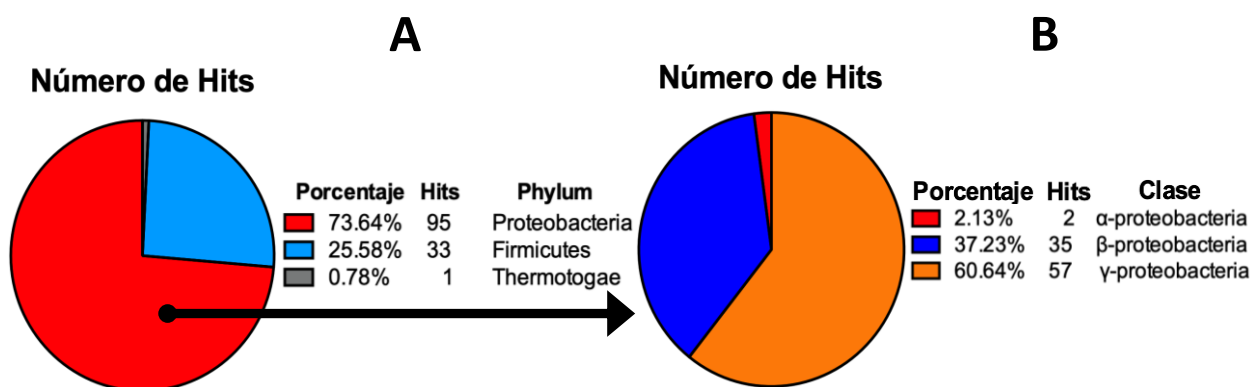


Figura 25: Búsqueda bidireccional. Resultados de la búsqueda en BlastP utilizando como consulta la secuencia "homóloga" a MotF de *Limnohabitans sp. 15K* (Base de Datos: nr, E-value > 0.005, Porcentaje de similitud > 30%). A- Gráfica de 129 hits representados en Proteobacterias, Firmicutes y Thermotogas. B- Gráfica de 95 hits representados en las subclases α , β y γ de las Proteobacterias.

Si bien la búsqueda bidireccional no resultó como se esperaba, los resultados obtenidos son interesantes. Si las secuencias encontradas en *Limnohabitans* se consideran homólogas a MotF, entonces los resultados sugieren que existe una relación distante entre MotF y proteínas quimiotácticas, lo cual podría señalar algún tipo de vínculo evolutivo y valdría la pena explorar esta posibilidad en futuros análisis.

Para reforzar la idea de que las secuencias encontradas son homólogas a MotF, se decidió hacer un análisis de estructura secundaria para comparar las secuencias presentes en el género *Limnohabitans* y la familia Rhodobacteraceae. Para ello, las secuencias de *R. sphaeroides* y *Limnohabitans sp 15K* fueron utilizadas en los programas PSIPRED y MEMSAT. Como resultado de este análisis se observa que ambas secuencias comparten la misma estructura secundaria, una larga α -hélice que cruza desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico mediante un cruce transmembranal, y regiones desordenadas en el amino y carboxilo terminal. Además, el programa PSIPRED predice la misma topología y orientación con respecto a la membrana interna, es decir, la pequeña región amino terminal ubicada en el citoplasma, y la larga región carboxilo terminal en el periplasma (Figura 26).



Figura 26: Estructura secundaria MotF. Comparación de estructura secundaria y topología entre homólogos de MotF en *R. sphaeroides* (Parte superior) y *Limnohabitans sp. 15K* (Parte inferior).

Cabe mencionar, que los residuos 238 y 239 de MotF, los cuales son importantes para la localización y estabilidad de la proteína, se encuentran muy conservados tanto en la familia Rhodobacteraceae como en el género *Limnohabitans*, como se puede observar en la figura 27.

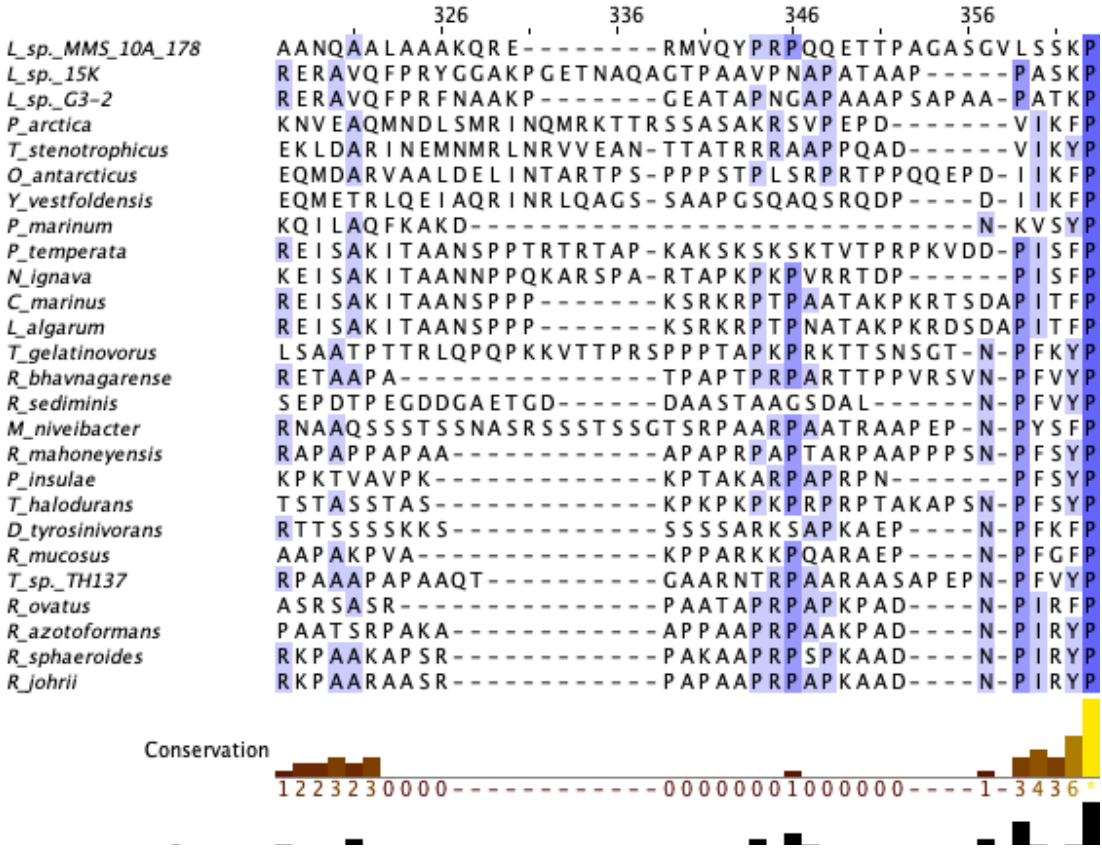


Figura 27: Alineamiento de homólogos a MotF. Alineamiento múltiple generado a partir de secuencias homólogas a MotF en 23 especies diferentes de la familia Rhodobacteraceae y 3 especies del género *Limnohabitans*. Se muestran los últimos 39 aminoácidos del carboxilo terminal.

En conjunto, estos resultados y observaciones indican alguna relación filogenética entre homólogos a MotF en las Rhodobacteraceae y el género *Limnohabitans*, con base en similitudes a nivel de secuencia, estructura secundaria y contexto genómico. Debido a la brecha evolutiva que existe entre estos dos grupos y evidencias como la incorporación del sistema flagelar 1 en *R. sphaeroides*, es posible asumir que el gen que codifica para la proteína MotF haya sido adquirido por un evento de transferencia horizontal.

Por lo cual se pueden plantear tres posibles escenarios: El primero en donde *motF* fue adquirido de manera independiente al locus Fla1, teniendo como posible donador a algún ancestro del género *Limnohabitans*. El segundo en donde *motF* haya sido adquirido en el mismo evento de transferencia que el locus Fla1, con un ancestro de *Limnohabitans* como donador. Y el tercero, en donde *motF* haya sido incorporado al genoma en conjunto con el Fla1 y que el donador haya transferido el locus de manera independiente a un ancestro de *Limnohabitans* y de las Rhodobacteraceas.

Para resolver estos escenarios, se realizó un análisis filogenético utilizando 5 proteínas flagelares altamente conservados (FlhA, FlhB, FlhG, FlhF y FlhP) y se utilizaron secuencias pertenecientes a 22, 20 y 18 especies de α , β y γ -proteobacterias, respectivamente.

Como resultado de este análisis, cercano a la raíz del árbol se puede observar que se agrupan los sistemas flagelares de las α -proteobacterias (0 y 0'), incluyendo el sistema flagelar II (Fla2) de *R. sphaeroides*, así como los sistemas endógenos presentes en la familia Rhodobacteraceae (0) (Señalados con letras en rojo) (Figura 28).

Derivado de los sistemas de las α -proteobacterias, se distingue un clado mayor (1) con dos cladros internos; el primero de ellos contiene únicamente especies de γ -proteobacterias no entéricas (1'), mientras que en el segundo clado se encuentran la mayoría de las especies de las β -proteobacterias en conjunto con las γ -proteobacterias entéricas (1'') (Figura 28).

Interesantemente, los sistemas presentes en el género *Limnohabitans* (2''), se agruparon en su mayoría con los sistemas flagelares 1 de las Rhodobacteraceas (2'), no así con el resto de las β -proteobacterias (1''). A excepción de la especie *Limnohabitans sp. MMS 10A 178* que posee dos sistemas flagelares, su primer sistema (Fla1) se agrupó con las especies del género *Limnohabitans* (2'), mientras que el segundo sistema (Fla2) se ubica con el resto de las β -proteobacterias (1''). Esto sugiere que al igual que *R. sphaeroides*, *Limnohabitans sp. MMS 10A 178* posee un sistema endógeno (Fla2) y un sistema exógeno (Fla1) (Figura 28).

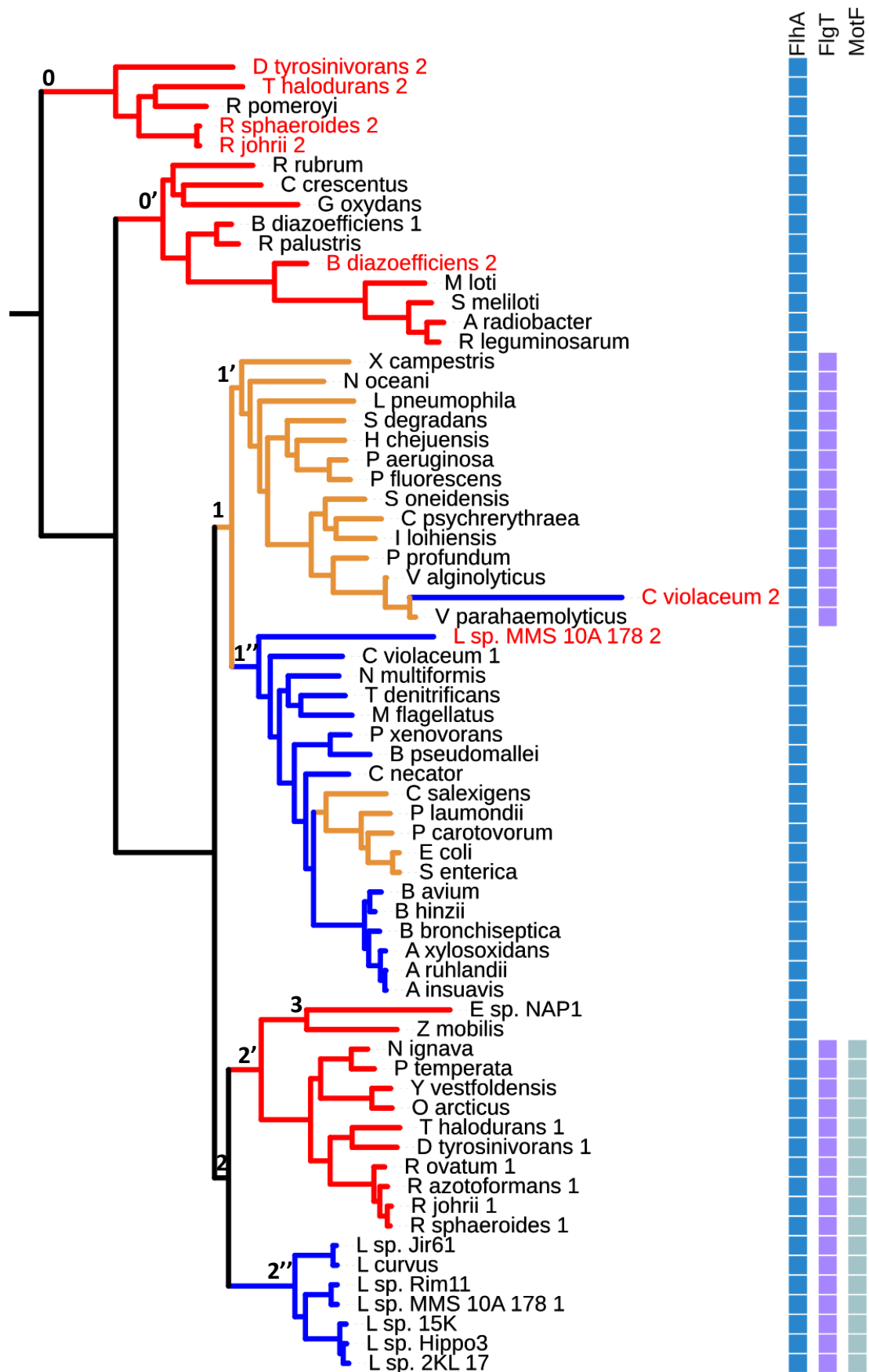


Figura 28: Árbol flagelar. Generado a partir de alineamientos múltiples concatenados de las proteínas FlhA, FlhB, FlgI, FlgJ y FlgK. Las líneas en color rojo corresponden a α -proteobacterias, en azul a β -proteobacterias y en naranja a γ -proteobacterias. Los segundos sistemas flagelares se señalan con letras rojas.

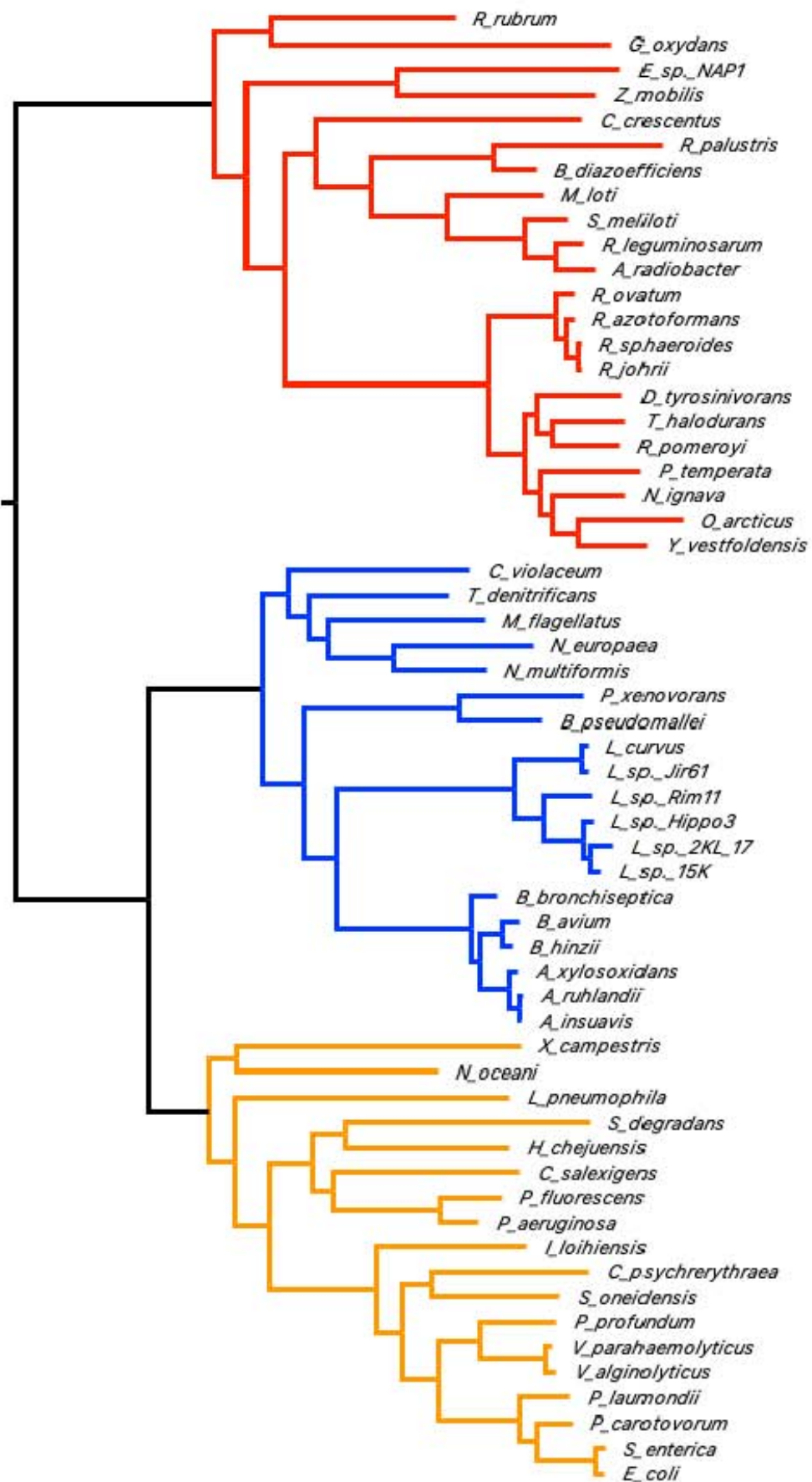


Figura 29: Árbol de referencia. Generado a partir de alineamientos múltiples concatenados de las proteínas UvrA, FtsH, NusA, DnaB, RplC, RplF, Lgt y ClpP. Las líneas en color rojo corresponden a α-proteobacterias, en azul a β-proteobacterias y en naranja a γ-proteobacterias.

Estos resultados sugieren que los sistemas Fla1 del clado (2) en las Rhodobacteraceas y *Limnohabitans*, fueron adquiridos mediante un evento de transferencia horizontal, ya que no están filogenéticamente relacionados con los sistemas endógenos de sus respectivas subclases (0 y 1'') (Figura 28).

Estudios previos sugirieron que el Fla1 fue adquirido por un ancestro de las Rhodobacteraceas y Sphingomonadales, donado por una γ -proteobacteria. El presente análisis muestra que el evento de transferencia ocurrió; sin embargo, indica que el donador no fue una γ -proteobacteria, sino un ancestro que dio origen a los sistemas flagelares de las β/γ -proteobacterias.

Cabe señalar que dentro del clado (2), *motF* y *flgT* están presentes en todas las especies, a excepción de las pertenecientes al grupo de las Sphingomonadales (3), *Erythrobacter sp NAP1* y *Zymomonas mobilis* (Figura 28). Debido a que el locus flagelar I fue adquirido por un ancestro de las Rhodobacteraceas y Sphingomonadales, es posible que el gen *motF* o una versión primitiva del gen, haya sido adquirido en el mismo evento de transferencia horizontal que el locus flagelar 1, y no en un segundo evento. Por lo tanto, la ausencia de *motF* y *flgT* en las Sphingomonadales sugiere que algún ancestro perdió dichos genes y posiblemente se desarrollaron mecanismos alternativos para permitir la motilidad en ausencia de dichos genes que son esenciales en las Rhodobacteraceas.

Finalmente, para determinar las relaciones evolutivas entre todas las especies de proteobacterias utilizadas en este análisis, se generó un árbol de referencia usando la misma metodología que se usó para el árbol flagelar, solo que usando secuencias de ocho proteínas de mantenimiento celular (UvrA, FtsH, NusA, DnaB, RplC, RplF, LgT y ClpP). En este árbol se observa que las α -proteobacterias son el grupo más ancestral y del cual se originó el grupo de las β y γ -proteobacterias (Figura 29).

En conjunto, todos estos resultados señalan al escenario número tres como posible acontecimiento. Los ancestros del género *Limnohabitans* y de la familia Rhodobacteraceae adquirieron el mismo sistema flagelar por eventos de transferencia horizontal independientes, teniendo como donador común a un ancestro de las β y γ -proteobacterias. Además, la presencia de *motF* en estos grupos indica que *motF*, o una versión primitiva del gen, fue adquirido en el mismo evento de transferencia horizontal que el locus Fla1.

Discusión

Ensayos de interacción mediante doble híbrido en levaduras

La interacción entre MotF y FlgT, analizada mediante doble híbrido, había sido reportada previamente (Fabela et al., 2013). A pesar de que es una interacción débil, en comparación con la que se establece entre monómeros de FlgT, se analizó mediante la misma técnica la dinámica MotF-FlgT en función de diferentes mutaciones en la Y238 de MotF.

Si bien se confirmaron los resultados previamente obtenidos, se esperaba que las mutaciones de la Y238 por alanina y glicina abolieran la interacción; sin embargo, esto no ocurrió. Cabe mencionar, que sí existe una disminución en el crecimiento en medio -LTHA consecuencia de las mutaciones (A y G), pero no lo suficiente como para evitar el crecimiento en el medio -LTH. Esto podría ser debido a una interacción inespecífica entre MotF y FlgT. En este sentido, se ha observado que cuando MotF se fusiona en el dominio de unión (BD) y se prueba la interacción únicamente con el dominio de activación (AD), se corrige la auxotrofía en medio -LTH (Datos no publicados). Es decir, que MotF interactúa de manera inespecífica con el dominio AD y permite el crecimiento de las levaduras.

En el caso del ensayo de las actividades de la β -galactosidasa, se esperaba que los resultados respaldaran cuantitativamente las diferencias observadas en el ensayo de doble híbrido; sin embargo, no se pudo detectar variación alguna entre las versiones silvestres y mutantes de MotF interactuando con FlgT.

A pesar de que interacciones débiles han sido evaluadas mediante este tipo de experimentos (Möckli y Auerbach, 2004), los niveles detectados en estas interacciones son similares a lo observado en el control negativo (AntT-Lam), por lo tanto no es posible obtener alguna conclusión de estos resultados, ya que el ensayo no es lo suficientemente sensible como para detectar este tipo de interacciones débiles, por lo que se sugiere repetir estos ensayos pero usando un sustrato más sensible (Galacton-Star) (Clontech).

En resumen, estos resultados *in vitro* no permiten concluir de manera clara la relevancia del residuo 238 de MotF para la interacción con FlgT. Es por ello por lo que se sugiere hacer otro tipo de experimentos, como ensayos de Pull-Down, Far-Western o ensayos de entrecruzamiento *in vivo* acoplados a espectrometría de masas para analizar de manera precisa la interacción entre estas dos proteínas claves para el flagelo 1 de *R. sphaeroides*.

La F315 es esencial para la estabilidad de FlgT

En el trabajo realizado por Terashima et al., (2013), se menciona la presencia en FlgT de una horquilla- β en el dominio carboxilo que es estabilizada por la interacción de dos pares de residuos aromáticos ubicados en los dominios amino y carboxilo. Esta interacción fue propuesta a partir de la estructura cristalográfica de FlgT; sin embargo, no existe evidencia experimental que compruebe la importancia de estas posibles interacciones.

Con los resultados presentados en este trabajo, se demuestra que el aminoácido aromático F315 de FlgT en *R. sphaeroides*, es necesario para la estabilidad de la proteína, debido a que la sustitución de este residuo por alanina resultó en la degradación de FlgT. Siendo así la primera evidencia experimental que demuestra la importancia de los residuos aromáticos.

También se demostró que la sustitución de las fenilalaninas 32 y 315 por alaninas no afecta la función de FlgT, por lo que la hipótesis de la posible interacción entre los anillos aromáticos en FlgT (F32 y F315) y en MotF (Y238) quedó descartada. Sin embargo, esto sugiere que dicha interacción existiría únicamente entre los residuos de FlgT, a pesar de encontrarse a una distancia mayor (8.4 Å) a la comúnmente aceptada (5 Å) (Martinez y Iverson, 2012). Cabe mencionar que dicha distancia fue obtenida a partir de un modelaje computacional, por lo que se requiere de evidencia estructural de FlgT de *R. sphaeroides* para corroborar tal suposición.

No obstante que las versiones mutantes en el carboxilo terminal de FlgT se degradan (ΔC , F315A y F32A-F315A), estas son parcialmente funcionales, ya que restablecen aproximadamente en un 40% el nado de la cepa SF3. Esta incongruencia podría ser explicada por el hecho de que sólo se requieren de 26 subunidades de FlgT para formar el anillo H (Zhu et al., 2020). Por lo tanto, es posible que la mayoría de las subunidades se degraden, pero existan las suficientes como para ensamblar el anillo y permitir el nado, es por esta razón que no pueden ser inmunodetectadas mediante Western blot.

Relevancia de los tipos de aminoácidos en el residuo 238 de MotF

En un estudio previo se demostró la importancia de la tirosina 238 de MotF para la localización de la proteína en la base del flagelo, ya que la tirosina puede ser sustituida por otros residuos aromáticos y seguir teniendo la misma función (Rodríguez-Méndez, 2018). Dado que la hipótesis de interacción por anillos aromáticos entre MotF y FlgT quedó descartada, se exploró la dinámica de otros tipos de aminoácidos en la posición 238 de MotF con el fin de proponer nuevas interacciones alternativas.

Los resultados presentados en este trabajo demostraron una correlación entre la funcionalidad y localización de MotF, acorde al tipo de aminoácido. Siendo los aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y de carga positiva como los más favorables, mientras que los de carga negativa, polares sin carga y apolares son menos favorecidos.

Si se busca la relación que tienen los aminoácidos de estos dos grupos, se puede decir que en aquellos que son favorecidos (aromáticos y de carga positiva) la característica en común es precisamente la carga. Si bien los residuos aromáticos no tienen como tal una carga positiva en su cadena lateral, a excepción de la tirosina (grupo OH^+), se ha propuesto que la resonancia de sus anillos aromáticos genera momentos dipolares con carga parcial negativa sobre ambas caras del anillo y una carga parcial positiva en la periferia del anillo (Martinez

y Iverson, 2012). Por lo tanto, estas cargas parciales podrían ser suficientes para una posible interacción con FlgT.

Estas observaciones sugieren una posible interacción electrostática entre MotF (carga⁺) y FlgT (carga⁻). Por lo que, para reforzar esta idea, se analizó el modelo computacional de FlgT generado en este trabajo para identificar sitios en la superficie altamente electronegativos. Como resultado de esta búsqueda se pudo identificar un bolsillo dentro de FlgT con dichas características que involucran los residuos D229 y E285 (Figura 30). Estas observaciones permiten proponer a estos dos residuos en FlgT como posibles responsables de la interacción con MotF, y se propone generar mutaciones puntuales en ellos para observar alteraciones en el nado y en la localización de MotF.

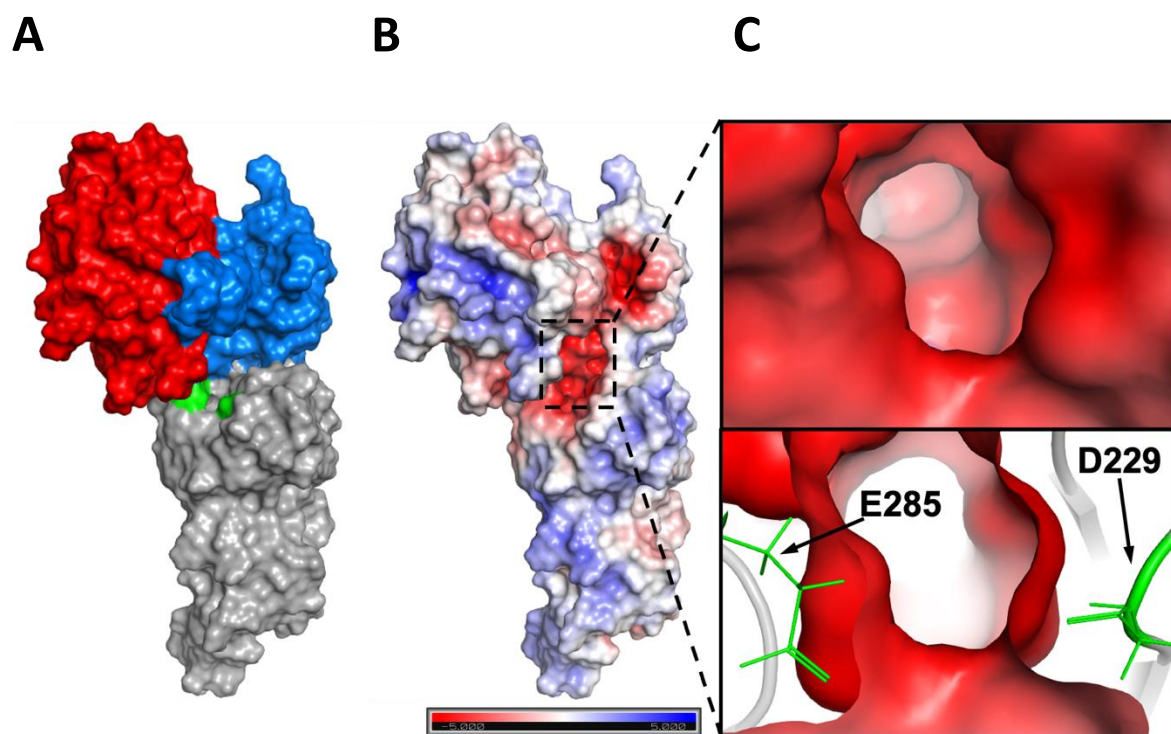


Figura 30: Superficie electrostática. A- Visualización de la superficie de FlgT a partir del modelo generado en I-TASSER. Se ilustran los aminoácidos D229 y E285 (verde), así como los dominios amino (rojo), medio (gris) y carboxilo (azul). B- Visualización de la superficie electrostática de FlgT generada por el programa “APBS Electrostatics”. C- Acercamiento al bolsillo electronegativo señalado con el recuadro punteado, en la parte inferior se ilustran las cadenas laterales de los aminoácidos de carga negativa antes mencionados.

MotF, FliL y FlgT y su papel en la activación de los estatores

Como se mencionó anteriormente, no se tiene evidencia sobre la funcionalidad de MotF una vez que la proteína es incorporada a la base del flagelo. Debido a mutaciones supresoras en MotB, se ha hipotetizado que en conjunto con FliL y FlgT, MotF podría estar involucrada en la apertura del “plug” de MotB.

Para analizar esta hipótesis y estudiar el papel de estas proteínas en la apertura del plug, se determinó analizar la dinámica del pegado de MotB al peptidoglicano en función de la presencia o ausencia de MotF, FliL y FlgT.

Los resultados presentados en este trabajo representan la primera evidencia que indica que MotB es capaz de unirse al peptidoglicano y a pesar de ello no ser funcional. Diferentes grupos mediante ensayos de interacción *in vitro* entre versiones de MotB purificadas y peptidoglicano purificado, han demostrado que se requiere de la incorporación de los estatores al flagelo para que MotB adquiera una conformación activa y pueda unirse al peptidoglicano (Andrews et al., 2017 y Kojima et al., 2018).

Los datos aquí mostrados sugieren que en el caso de *R. sphaeroides* esto no ocurre, ya que en ausencia de MotF, FliL y FlgT se pudo detectar MotB unida al peptidoglicano. Esto sugiere que, en estas cepas mutantes, los estatores ya se encuentran incorporados en el flagelo y anclados al peptidoglicano, pero no han sido activados. Por lo tanto, además de la remodelación que ocurre en el dominio periplásmico de MotB para el anclaje, se requiere de un paso adicional para completar el proceso de activación y la apertura del “plug”.

Este paso adicional es posiblemente mediado por MotF, FliL y FlgT de manera independiente y/o en conjunto. En cuanto a FlgT, se sabe por experimentos en *Vibrio* que la proteína sirve como andamiaje para las proteínas MotX y MotY que forman el anillo T (Zhu et al., 2020), el cual está involucrado en el reclutamiento de los estatores a la base del

flagelo. Cabe mencionar que en el genoma de *R. sphaeroides*, no se han encontrado homólogos que codifiquen para las proteínas MotX y MotY.

De tener un mecanismo de reclutamiento de estatores en *R. sphaeroides* similar al de *Vibrio*, la ausencia de FlgT tendría como resultado la falta de incorporación de las proteínas que cumplen la función de MotX y MotY, y a consecuencia de ello, la pérdida en el reclutamiento y anclaje de los estatores. La evidencia mostrada en este trabajo indica que en ausencia del anillo H formado por FlgT, MotB sí se une al peptidoglicano. Sugiriendo que, a diferencia de *Vibrio*, no se requiere de FlgT, MotX y MotY para que los estatores sean reclutados, y que dicho proceso es llevado a cabo mediante otro proceso u otra interacción que hasta el momento se desconoce.

En el caso de FliL, se ha reportado evidencia cristalográfica en donde se observa que esta proteína forma una estructura anular en el espacio periplásmico, la cual tiene las dimensiones apropiadas para rodear un complejo MotAB (4:2). FliL de esta manera es estabilizada, interactúa con los estatores y se sugiere que asiste a MotB en el pegado al peptidoglicano (Takekawa et al., 2019). Sin embargo, estos resultados señalan que FliL no está involucrada en el anclaje de los estatores ni en su reclutamiento, solo en su activación.

Por último, ha sido reportado ampliamente que MotF es indispensable para la rotación flagelar y que su localización depende por completo de FlgT (Fabela et al., 2013 y Rodríguez Méndez, 2018). A su vez, MotF no participa en la formación del filamento, ni en la formación de los anillos L, P y H, y por los resultados aquí obtenidos, tampoco es relevante para el reclutamiento y el anclaje de los estatores al peptidoglicano. Por lo tanto, estas observaciones permiten señalar que la cepa que carece de MotF (VR1) ya tiene todo el sistema flagelar 1 ensamblado y listo para funcionar, solo se necesita activarlo. Es por ello que se propone a MotF como la principal candidata para llevar a cabo la activación de los estatores.

Ortólogos a MotF y su adquisición por transferencia horizontal

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron la presencia de homólogos de MotF en una subclase diferente a las α -proteobacterias. Dicha proteína fue identificada en especies del género *Limnohabitans* perteneciente al grupo de las β -proteobacterias. En donde la similitud en estructura secundaria, la conservación de los residuos Y238 y P239, la sintenia en el arreglo del locus flagelar, y la relación filogenética de sus sistemas flagelares indican que en realidad son ortólogos.

Los análisis filogenéticos mostraron que los sistemas flagelares 1 de las Rhodobacteraceas están filogenéticamente relacionados con los sistemas del género *Limnohabitans*, no así con los sistemas endógenos correspondientes de las α y β -proteobacterias. Lo que significa que dichos sistemas son resultado de un evento de transferencia horizontal, tal y como había sido reportado previamente en diversos trabajos (Liu y Ochman, 2007; Poggio *et al.*, 2007 y Beeby *et al.*, 2020).

Además, la presencia de ortólogos de MotF en dichos sistemas sugiere que la proteína tiene un origen en común y que el gen que codifica para la proteína fue adquirido en conjunto con el sistema flagelar tanto en *Limnohabitans* como en las Rhodobacteraceas, a excepción de las Sphingomonadales en donde parece ser que el gen está ausente. Esto último resulta muy interesante, ya que en el caso de *Zymomonas mobilis*, las células ensamblan un flagelo polar y son móviles (Lynn-Dunn, 2015). Esto podría señalar dos posibles alternativas; una en donde MotF sí está presente dentro de este grupo, pero por algún motivo no se ha encontrado mediante las búsquedas bioinformáticas; o que MotF en verdad está ausente y su flagelo es funcional por algún otro mecanismo diferente que no requiere de MotF.

Por último, si bien los datos aquí mostrados indican y confirman claramente que los sistemas flagelares 1 son resultado de eventos de transferencia horizontal, los resultados señalan que el donador no fue una γ -proteobacteria, sino que fue un ancestro que dio origen a los sistemas flagelares presentes en las γ y β -proteobacterias, contrario a lo que se había mencionado anteriormente (Poggio et al., 2007). Además, esta afirmación sugiere que los eventos de transferencia horizontal son ancestrales y que el sistema flagelar 1 se ha mantenido por un largo tiempo bajo una presión de selección positiva, siendo un claro ejemplo de adaptación evolutiva.

Conclusión

1. Por los ensayos realizados en este trabajo mediante doble-híbrido, no se puede afirmar que el residuo 238 de MotF es relevante para la interacción con FlgT.
2. La interacción entre MotF y FlgT no ocurre a través de los residuos aromáticos Y238 en MotF y F32-F315 en FlgT.
3. La F315 de FlgT es importante para la estabilidad de la proteína, no así la F32.
4. La Y238 de MotF puede ser sustituida por aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y de carga positiva. No así por aminoácidos apolares, polares sin carga y de carga negativa.
5. MotB es capaz de unirse al peptidoglicano en ausencia de MotF, FliL y FlgT, por lo que se sugiere que estas tres últimas proteínas están involucradas en la activación de los estatores mediante la apertura del plug de MotB.
6. Los homólogos a MotF encontrados en el género *Limnohabitans* son ortólogos.
7. Los sistemas flagelares de las *Limnohabitans* y las Rhodobacteraceas son resultado de dos eventos independientes de transferencia horizontal, teniendo como donador a un ancestro de las γ y β -proteobacterias.
8. *motF* fue adquirido en conjunto con el locus flagelar 1.

Perspectivas

1. Realizar otro tipo de ensayos in vitro para probar la interacción entre MotF y FlgT. Como un ensayo de entrecruzamiento acoplado a espectrometría de masas.
2. Se propone obtener mutaciones puntuales en los residuos D229 y E285 de FlgT para analizar una posible interacción electrostática entre MotF y FlgT.
3. Analizar mediante microscopía electrónica cuerpos basales de las cepas que expresan el alelo mutante en la F315 de FlgT, con el fin de observar posibles alteraciones estructurales en el anillo H que expliquen las deficiencias en el nado.
4. Realizar un ensayo de complementación con un ortólogo a MotF de *Limnohabitans* en la cepa VR1 de *R. sphaeroides*.

Referencias

1. Aizawa, S. I., Dean, G. E., Jones, C. J., Macnab, R. M., & Yamaguchi, S. (1985). Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, *161*(3), 836.
1. Akiba, T., Yoshimura, H., & Namba, K. (1991). Monolayer crystallization of flagellar LP rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science*, *252*(5012), 1544-1546.
2. Andrews, D. A., Nesmelov, Y. E., Wilce, M. C., & Roujeinikova, A. (2017). Structural analysis of variant of *Helicobacter pylori* MotB in its activated form, engineered as chimera of MotB and leucine zipper. *Scientific reports*, *7*(1), 1-12.
3. Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R., & Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, *14*(6), 920-924.
4. Beeby, M., Ferreira, J. L., Tripp, P., Albers, S. V., & Mitchell, D. R. (2020). Propulsive nanomachines: the convergent evolution of archaella, flagella and cilia. *FEMS microbiology reviews*, *44*(3), 253-304.
1. Blair, D. F., & Berg, H. C. (1991). Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *Journal of molecular biology*, *221*(4), 1433-1442.
2. Blankenship, R. E., Madigan, M. T., & Bauer, C. E. (Eds.). (2006). *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
3. Braun, T. F., Poulson, S., Gully, J. B., Empey, J. C., Van Way, S., Putnam, A., & Blair, D. F. (1999). Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *181*(11), 3542.
4. Braun, T. F., Al-Mawsawi, L. Q., Kojima, S., & Blair, D. F. (2004). Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *43*(1), 35-45.
5. Boyer, H. W., & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, *41*(3), 459-472.
6. Camarena, L., & Dreyfus, G. (2020). Living in a Foster Home: The Single Subpolar Flagellum Fla1 of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomolecules*, *10*(5), 774.
7. Cameron, D. E., Urbach, J. M., & Mekalanos, J. J. (2008). A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(25), 8736-8741.
8. Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(21), 9578-9582
9. Che, Y. S., Nakamura, S., Kojima, S., Kami-ike, N., Namba, K., & Minamino, T. (2008). Suppressor analysis of the MotB (D33E) mutation to probe bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation. *Journal of bacteriology*, *190*(20), 6660.
10. Chevance, F. F., & Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(6), 455-465.
11. Dean, G. E., Macnab, R. M., Stader, 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.
12. Deme, J. C., Johnson, S., Vickery, O., Aron, A., Monkhouse, H., Griffiths, T., ... & Lea, S. M. (2020). Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nature Microbiology*, *5*(12), 1553-1564.
13. Dunstan, R. H., Kelley, B. C., & Nicholas, D. J. (1982). Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. *Journal of bacteriology*, *150*(1), 100.
14. Erhardt, M., Hirano, T., Su, Y., Paul, K., Wee, D. H., Mizuno, S., ... & Hughes, K. T. (2010). The role of the FliK molecular ruler in hook-length control in *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, *75*(5), 1272-1284.

15. Fields, S. (1993). The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods*, 5(2), 116-124.
16. Fraser, G. M., Hirano, T., Ferris, H. U., Devgan, L. L., Kihara, M., & Macnab, R. M. (2003). Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. *Molecular microbiology*, 48(4), 1043-1057.
17. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805-816.
18. Hizukuri, Y., Kojima, S., Yakushi, T., Kawagishi, I., & Homma, M. (2008). Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 154(Pt 3), 810.
19. Homma, M. I. C. H. I. O., Komeda, Y. O. S. H. I. B. U. M. I., Iino, T. E. T. S. U. O., & Macnab, R. M. (1987). The flaFIX gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *Journal of bacteriology*, 169(4), 1493.
20. Homma, M., DeRosier, D. J., & Macnab, R. M. (1990) A. 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), 819-832.
21. Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T., & Macnab, R. M. (1990) B. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG: a family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular biology*, 211(2), 465-477.
22. Hong, H. J., Kim, T. H., Song, W. S., Ko, H. J., Lee, G. S., Kang, S. G., ... & Yoon, S. I. (2018). Crystal structure of FlgL and its implications for flagellar assembly. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
23. Hosking, E. R., Vogt, C., Bakker, E. P., & Manson, M. D. (2006). The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *Journal of molecular biology*, 364(5), 921-937.
24. Irikura, V. M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H., & Macnab, R. M. (1993). *Salmonella typhimurium* fliG and fliN mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 802.
25. Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, 8(6), 1693-1696.
26. James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), 1425-1436.
27. Kaplan, M., Sweredoski, M. J., Rodrigues, J. P., Tocheva, E. I., Chang, Y. W., Ortega, D. R., ... & Jensen, G. J. (2020). Bacterial flagellar motor PL-ring disassembly subcomplexes are widespread and ancient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(16), 8941-8947.
28. Kojima, S., & Blair, D. F. (2001). Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry*, 40(43), 13041-13050.
29. Kojima, S., & Blair, D. F. (2004). Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 43(1), 26-34.
30. Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., ... & Namba, K. (2009). Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Molecular microbiology*, 73(4), 710-718.
31. Kojima, S., Takao, M., Almira, G., Kawahara, I., Sakuma, M., Homma, M., ... & 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.
32. Kuhlen, L., Abrusci, P., Johnson, S., Gault, J., Deme, J., Caesar, J., ... & Lea, S. M. (2018). Structure of the core of the type III secretion system export apparatus. *Nature structural & molecular biology*, 25(7), 583-590.
33. Kutsukake, K., Minamino, T., & Yokoseki, T. (1994). Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 176(24), 7625.
34. Liu, R., & Ochman, H. (2007). Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *Journal of bacteriology*, 189(19), 7098-7104.
35. Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., & Armitage, J. P. (2006). Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature*, 443(7109), 355-358.

36. Louvet, O., Doignon, F., & Crouzet, M. (1997). Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques*, 23(5), 816-820.
37. Lynn Dunn, K. 2015. Engineering *Zymomonas Mobilis* for the production of biofuels and other value-added products. Professional thesis to obtain the degree in Doctor of Philosophy in Chemical Engineering. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois. 160.
38. Macnab, R. (1996). Flagella and Motility in *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhardt, FC, chief-ed.) pp. 123–145. *American Society for Microbiology, Washington, DC*.
39. Macnab, R. M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 207-217.
40. Martinez, R. M., Dharmasena, M. N., Kirn, T. J., & Taylor, R. K. (2009). Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *Journal of bacteriology*, 191(18), 5669.
41. Martinez, C. R., & Iverson, B. L. (2012). Rethinking the term “pi-stacking”. *Chemical Science*, 3(7), 2191-2201.
42. Matsunami, H., Barker, C. S., Yoon, Y. H., Wolf, M., & Samatey, F. A. (2016). Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions. *Nature communications*, 7(1), 1-10.
43. Meza, B. 2015. Papel de la región carboxilo terminal de la proteína Motf en la rotación del flagelo de *Rhodobacter Sphaeroides*. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx. 65.
44. Minamino, T., & Macnab, R. M. (1999). Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1388.
45. Minamino, T., Ferris, H. U., Moriya, N., Kihara, M., & Namba, K. (2006). Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *Journal of molecular biology*, 362(5), 1148-1158.
46. Möckli, N., & Auerbach, D. (2004). Quantitative β -galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *Biotechniques*, 36(5), 872-876.
47. Morimoto, Y. V., Che, Y. S., Minamino, T., & Namba, K. (2010). Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. *FEBS letters*, 584(6), 1268-1272.
48. Morimoto, Y. V., & Minamino, T. (2021). Architecture and Assembly of the Bacterial Flagellar Motor Complex. In *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function* (pp. 297-321). Springer, Cham.
49. Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M., & Kutsukake, K. (1999). Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 181(5), 1555.
50. 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.
51. 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.
52. Porter, S. L., Wilkinson, D. A., Byles, E. D., Wadhams, G. H., Taylor, S., Saunders, N. J., & Armitage, J. P. (2011). Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* strain WS8N. *Journal of bacteriology*, 193(15), 4027.
53. Pucciarelli M. G., & García-del Portillo, F. (2003). Protein–peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. *Molecular microbiology*, 48(2), 573-585
54. Ramírez-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. *Journal of bacteriology*, 194(22), 6174.

55. Reid, S. W., Leake, M. C., Chandler, J. H., Lo, C. J., Armitage, J. P., & Berry, R. M. (2006). The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(21), 8066-8071.
56. Rodríguez Méndez, D. 2018. Relevancia funcional de los residuos conservados del carboxilo terminal de la proteína flagelar MotF en *Rhodobacter sphaeroides*. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx. 80.
57. Santiveri, M., Roa-Eguiara, A., Kühne, C., Wadhwa, N., Hu, H., Berg, H. C., ... & Taylor, N. M. (2020). Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor. *Cell*, *183*(1), 244-257.
58. Sircar, R., Borbat, P. P., Lynch, M. J., Bhatnagar, J., Beyersdorf, M. S., Halkides, C. J., ... & Crane, B. R. (2015). Assembly states of FliM and FliG within the flagellar switch complex. *Journal of molecular biology*, *427*(4), 867-886.
59. Sockett, R. E., Foster, J. C., & Armitage, J. P. (1990). Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. In *Molecular biology of membrane-bound complexes in phototrophic bacteria* (pp. 473-478). Springer, Boston, MA.
60. Sockett, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V. M., & Macnab, R. M. (1992). Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, *174*(3), 793.
61. Suaste-Olmos, F., Domenzain, C., Mireles-Rodríguez, J. C., 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.
62. Takekawa, N., Isumi, M., Terashima, H., Zhu, S., Nishino, Y., Sakuma, M., ... & Imada, K. (2019). Structure of *Vibrio* FliL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function. *MBio*, *10*(2), e00292-19.
63. 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.
64. 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.
65. Ueno, T., Oosawa, K., & Aizawa, S. I. (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. *Journal of molecular biology*, *227*(3), 672-677.
66. Zaloba, P., Bailey-Elkin, B. A., Derksen, M., & Mark, B. L. (2016). Structural and biochemical insights into the peptidoglycan hydrolase domain of FlgJ from *Salmonella typhimurium*. *PLoS One*, *11*(2), e0149204.
67. Zhou, J., Fazzio, R. T., & Blair, D. F. (1995). Membrane Topology of the MotA Protein of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, *251*(2), 237-242.
68. Zhou, J., & Blair, D. F. (1997). Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *Journal of molecular biology*, *273*(2), 428-439.
69. Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H. L., Lloyd, S. A., Billings, S., Braun, T. F., & Blair, D. F. (1998) A. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *Journal of bacteriology*, *180*(10), 2729.
70. Zhou, J., Lloyd, S. A., & Blair, D. F. (1998) B. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(11), 6436-6441.
71. Zhu, S., Nishikino, T., Takekawa, N., Terashima, H., Kojima, S., Imada, K., ... & Liu, J. (2020). In situ structure of the *Vibrio* polar flagellum reveals a distinct outer membrane complex and its specific interaction with the stator. *Journal of bacteriology*, *202*(4).