



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LOS MARCOS DE LECTURA
ABIERTOS (ORFs) RSP6090 Y RSP0038 DEL
SISTEMA FLAGELAR 1 DE *Rhodobacter sphaeroides***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

KEBEK ROMERO ENRIQUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS**

2022

Ciudad Universitaria, CD. MX.



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Romero

Enríquez

Kebek

(55) 76632655

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

313325069

2. Datos del tutor

Dr.

Francisco Javier

de la Mora

Bravo

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Adrián Fernando

Álvarez

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Rosa Laura

Camarena

Mejía

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Edén Marcela

Rodríguez

Flores

7. Datos del trabajo escrito.

Estudio de los marcos de lectura abiertos (ORFs) RSP6090 y RSP0038 del sistema flagelar 1 de *Rhodobacter sphaeroides*.

60 p.

2022

Agradecimientos

Como un homenaje póstumo, quiero agradecer al Dr. Georges Dreyfus Cortés por recibirme en su laboratorio; darme toda la confianza y apoyo para poder llevar a cabo esta investigación en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Dr. Francisco Javier de la Mora por tomar parte como mi tutor, además de todo el apoyo técnico, la confianza y sobre todo el aprendizaje; necesarios para que pudiera culminar con éxito este proyecto.

A la QFB. Teresa Ballado por el apoyo y asesoría brindada en mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado, por la atención y el esfuerzo invertido en la revisión de este trabajo; sus comentarios, puntos de vista y conocimientos compartidos conmigo enriquecieron este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por brindarme todo lo necesario para mi formación profesional como biólogo.

Dedicatorias

Sin duda alguna a mis padres, Hugo y Vianney, por todo el apoyo, cariño, confianza y dedicación que han puesto en mi formación, no solo profesional, sino como persona. A ellos les dedico cada uno de mis logros, les agradezco por siempre estar y nunca dejarme solo en los momentos difíciles. Los esfuerzos que hacen día con día me han hecho llegar hasta aquí.

A mi hermano Itzá, por estar conmigo en todo momento, por su confianza y por todo el cariño que se puede obtener de una hermandad.

A mis abuelos, tíos y primos, quienes siempre me han dado su apoyo incondicional.

A mis amigos: Enrique, Raúl, Diego y Roberto, quienes han formado parte de mi vida desde que nos conocimos en secundaria; con los que siempre puedo contar y tener la seguridad de que estarán ahí sin importar las circunstancias.

A los profesores de la Facultad de Ciencias; con sus enseñanzas pude alcanzar mi meta.

A Victoria Sánchez, por estar a mi lado durante los últimos años, siempre apoyándome y dándome ánimo; viendo por mi bienestar, llenándome de cariño y haciéndome mejor persona día a día.

“Gentlemen, it is the microbes who will have the last word.”

Louis Pasteur

ÍNDICE

Resumen	- 1 -
Introducción	- 2 -
Flagelo bacteriano.....	- 2 -
Filamento.....	- 3 -
Gancho y Proteínas Asociadas al Gancho (HAP).....	- 4 -
Cuerpo basal.....	- 6 -
Aparato de exportación.....	- 7 -
Sistema estator.....	- 9 -
Regulación transcripcional y biogénesis flagelar.....	- 13 -
Quimiotaxis.....	- 15 -
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	- 17 -
Planteamiento del Problema	- 20 -
Hipótesis	- 21 -
Objetivos	- 22 -
Materiales y métodos	- 23 -
Resultados	- 29 -
Análisis bioinformáticos.....	- 29 -
Mutación en RSP6090 y RSP0038.....	- 34 -
Medición del halo de nado en placas de agar suave.....	- 34 -
Velocidad de las cepas y número de paros por segundo.....	- 35 -
Modificación de las variables de las placas de nado.....	- 37 -
Velocidad de las cepas: modificación de viscosidad y pH del medio.....	- 39 -
Fenotipo de la doble mutante.....	- 41 -
Incremento en el número de proteínas MotA y MotB.....	- 42 -
Complementación de las mutantes con pRK415/FliL.....	- 44 -
Discusión	- 46 -
Conclusiones	- 52 -
Perspectivas	- 53 -
Referencias	- 54 -

Resumen

Las bacterias utilizan mecanismos muy diversos para desplazarse sobre su medio, ya sea líquido o sólido. En medios líquidos, usan una estructura macromolecular conocida como flagelo. Esta estructura funciona como un motor rotatorio, que consta de un rotor y un estator; utiliza la energía que proporciona el gradiente electroquímico de iones como H^+ y Na^+ , lo que permite el desplazamiento de la célula.

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria fotosintética, Gram negativa, perteneciente a las alfa proteobacterias. Este organismo presenta dos conjuntos completos de genes flagelares denominados Fla1 y Fla2. Se sabe que Fla1 se adquirió por transferencia horizontal a partir de un ancestro de las gammaproteobacterias, mientras que Fla2 es endógeno de la bacteria. Dentro del *locus* de Fla1 se han identificado dos marcos de lectura abierta (ORFs) designados como RSP6090 y RSP0038, cuya función es desconocida. Mediante una búsqueda bioinformática se observó que el ORF RSP6090 sintetiza una proteína hipotética de 161 aa, la cual guarda similitud con la proteína flagelar FliL; mientras que el ORF RSP0038 predice ser una proteína hipotética de 62 aa. Ambos ORFs están restringidos a la familia Rhodobacteraceae, así como el contexto genético en el que se encuentran. Localizamos a estos ORFs junto con operones que contienen componentes del motor flagelar, por lo que su función podría estar relacionada con éste.

Se generaron mutantes para RSP6090 y RSP0038, y se analizó su fenotipo mediante placas de nado de agar suave. El resultado fue un fenotipo de nado disminuido respecto a la cepa silvestre de un 40% para RSP6090 y un 20% para RSP0038. Esta reducción puede deberse a la velocidad disminuida de nado en la mutante RSP6090; mientras que en RSP0038, posiblemente se deba al aumento en el número de reorientaciones. Al aumentar la viscosidad del medio de desplazamiento, la mutante RSP6090 reduce su velocidad en una mayor magnitud que la cepa silvestre. Esto podría indicar que se ve comprometida en su capacidad de generación de torque.

RSP6090 puede ser un homólogo lejano de FliL, una duplicación genética que se ha mantenido a través de la historia evolutiva de *R. sphaeroides*. El estudio de RSP0038 requiere una mayor investigación, pero su función puede estar relacionada con RSP6090, probablemente como una chaperona.

Introducción

Desde la antigüedad, el movimiento ha representado una de las características más evidentes de la vida. Entre los organismos, la motilidad puede ser un factor determinante para la supervivencia; ya que permite a los organismos conseguir nutrientes o escapar de sus depredadores y de toxinas. En el dominio Bacteria esto no es diferente. Durante los primeros años de estudio de los microorganismos se observó que éstos eran capaces de desplazarse y de cambiar su dirección de nado de forma aleatoria. La investigación realizada y el conocimiento adquirido a través del estudio de la motilidad bacteriana ha dado lugar a grandes avances en las áreas de la microbiología y la física, que en conjunto ha ayudado a hacer de la quimotaxis basada en los episodios de nado y reorientación (*run and tumble*) el paradigma del movimiento bacteriano (Mitchell y Kogure, 2006).

A lo largo de la historia evolutiva, las bacterias han desarrollado distintas estrategias de motilidad para desplazamientos en superficies sólidas, semisólidas o líquidas; lo que les ha permitido aumentar su adecuación y, por tanto, desarrollar una adaptabilidad a su medio. Algunas de estas estrategias son: corrimiento (*sliding*), nado en enjambre (*swarming*), deslizamiento (*gliding*) y nado (*swimming*). De éstas, las bacterias usan *swimming* y *swarming* para desplazarse en medios acuosos, mientras *sliding* y *gliding* para hacerlo en superficies sólidas y semisólidas (Nan y Zusman, 2017). En especial, el nado se caracteriza por la participación del flagelo, el cual rota en una dirección específica para propulsar a la bacteria en medios líquidos.

La motilidad bacteriana dependiente de la maquinaria flagelar se considera fundamental en la evolución del dominio Bacteria. El estudio del flagelo comenzó con trabajos descriptivos y observacionales de los movimientos y tendencias que seguían las bacterias para llegar a una zona con alta concentración de nutrientes (Armitage, 1999). Por otra parte, existe una gran variabilidad en cuanto el número, posición y configuración de los flagelos en las bacterias, lo que indica que posiblemente durante la evolución este organelo se ha optimizado como una respuesta a la presión de selección ecológica de nicho en cada especie bacteriana (Hottes et al., 2013).

Flagelo bacteriano

El flagelo es una estructura macromolecular compuesta de al menos 30 proteínas estructurales únicas. Gran parte de la investigación flagelar se ha realizado en *Escherichia coli* y

Salmonella enterica. De forma general, el flagelo se ha dividido en tres partes primordiales: cuerpo basal, gancho y filamento (Figura 1).

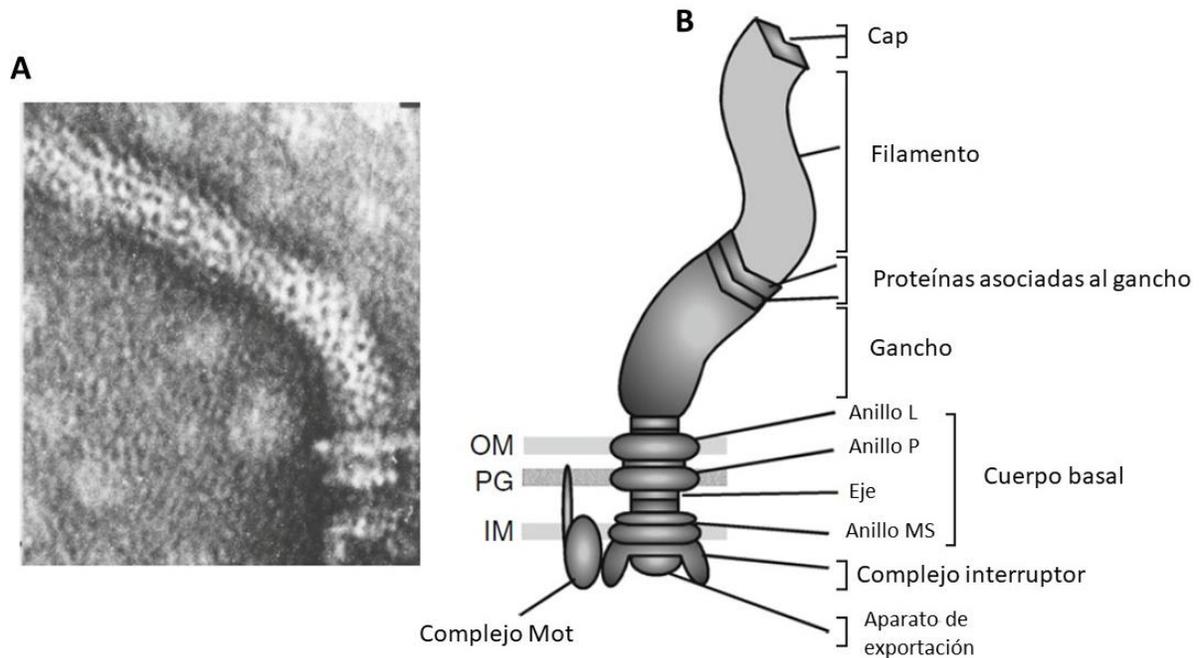


Figura 1. El flagelo bacteriano. (A) Micrografía electrónica del flagelo de *Salmonella typhimurium*. (B) Representación esquemática de la estructura mostrada en A. (Modificado de Terashima, Kojima, & Homma, 2008).

Filamento

El filamento es la estructura predominante del flagelo. Se localiza al exterior de la célula y puede tener una longitud de hasta 15 μm . En el espacio tridimensional, adopta una conformación helicoidal y su rotación propulsa a la célula permitiendo el nado en medios líquidos. Se compone de alrededor de 30,000 copias de flagelina (FliC) que se superponen de forma helicoidal, formando 11 protofilamentos. Los protofilamentos pueden alternarse entre dos conformaciones conocidas como R y L. Una variación entre estas conformaciones da lugar a la estructura helicoidal del flagelo. Para el correcto ensamblaje del filamento, se requiere de la proteína FliD (HAP2), ya que esta evita que las subunidades de FliC se liberen al espacio extracelular. Por otra parte, HAP2 induce un cambio conformacional en la flagelina para su correcta polimerización (Carroll y Liu, 2020).

La estructura cristalográfica de la flagelina se obtuvo de *S. enterica* a través de difracción de rayos X (Samatey et al., 2001). Se determinó que la proteína está compuesta de 4 dominios: D0, D1, D2 y D3. Los dominios D0 y D1 forman un núcleo central densamente empaquetado que consiste en una estructura tubular doble concéntrica. Por otra parte, los dominios D2 y D3 se proyectan fuera del núcleo del filamento y están relativamente separados entre sí. El dominio D1 comprende un segmento amino terminal de Ala 44 a Gln 176 y un segmento carboxilo terminal de Asn 406 a Glu 454. El dominio D2 también comprende dos segmentos: Lys 177 a Gly 189 y Ala 284 a Glu 405. Un segmento central de Tyr 190 a Val 283 constituye el dominio D3. Los tres dominios están conectados por pares de cadenas antiparalelas cortas (Figura 2). El diámetro del filamento es de aproximadamente 230 Å y el del canal central es de aproximadamente 20 Å (Yamashita et al., 1998).

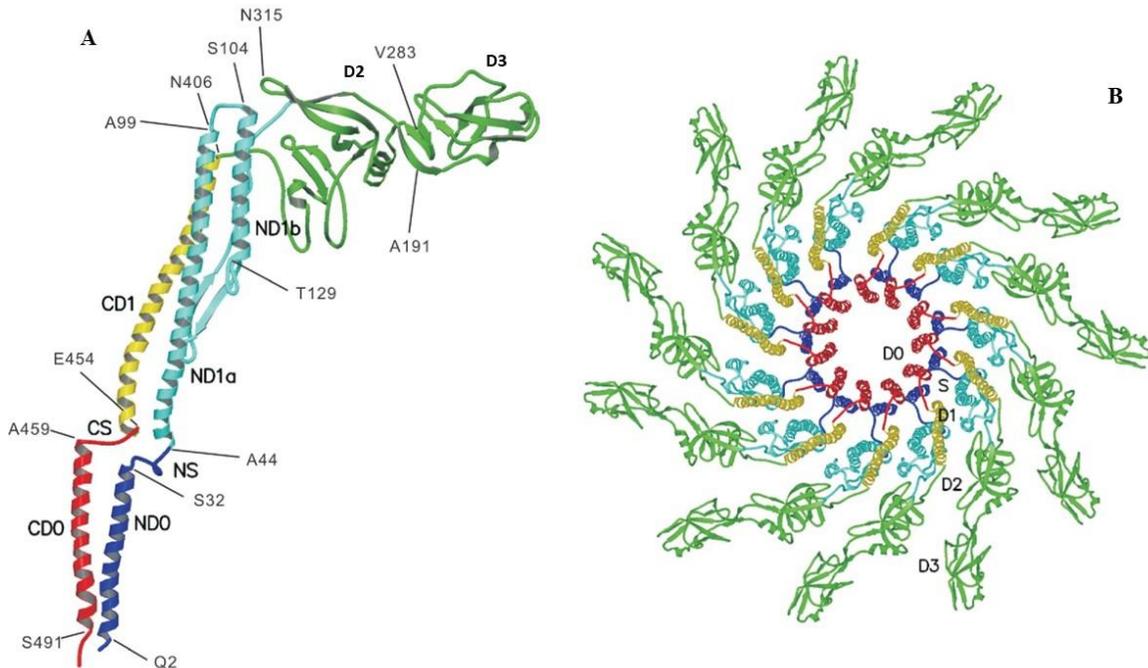


Figura 2. Componentes del filamento en *Salmonella enterica*. A) Estructura tridimensional de la flagelina (FliC). Se muestran los residuos que determinan el inicio y fin de cada dominio. B) Vista superior de la estructura flagelar en la que se muestra el arreglo de los dominios de la flagelina (Modificado de Yonekura *et al*, 2003).

Gancho y Proteínas Asociadas al Gancho (HAP)

El gancho es una estructura tubular semirrígida que conecta al filamento con el cuerpo basal, su función es transferir el torque del motor hacia el filamento. Está compuesto por alrededor de 120 subunidades de una sola proteína, FlgE, las cuales se disponen de forma helicoidal constituyendo una estructura tubular de 55 nm de longitud (Fujii et al., 2009). El gancho se compone de 11 protofilamentos y se ensambla mediante la proteína FlgD, la cual es necesaria para la polimerización de FlgE. La longitud del gancho es importante para asegurar la estabilidad del haz flagelar. Los ganchos cortos son demasiado rígidos para funcionar como un conector universal, mientras que los ganchos muy largos crean inestabilidad en el flagelo. Debido a esto, la longitud está controlada por la proteína FliK que funciona como una regla molecular, la cual se secreta a través del aparato de exportación tipo III durante el ensamblaje del gancho (Ohnishi et al., 1994)

A partir de difracción de rayos X, se obtuvo la estructura cristalográfica de FlgE de *Salmonella*, demostrando que está compuesta por tres dominios estructurales, D0, D1 y D2, y una región Dc que conecta los dominios D0 y D1 (Figura 3). El arreglo estructural de FlgE es similar al de FliC en el filamento. Sin embargo, diferencias mecánicas y estructurales impiden que el gancho y el filamento se unan de forma directa. Debido a esto, es necesaria la presencia de proteínas accesorias que facilitan su unión. Estas proteínas se conocen como HAP (*Hook Associated Proteins*): HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL). La función de éstas es la adaptación estructural y mecánica entre el gancho y el filamento. Ambas proteínas se ensamblan en el extremo distal del gancho. De forma que HAP1 se une directamente al gancho y HAP3 sirve de unión entre HAP1 y el filamento (Moriya et al., 2011).

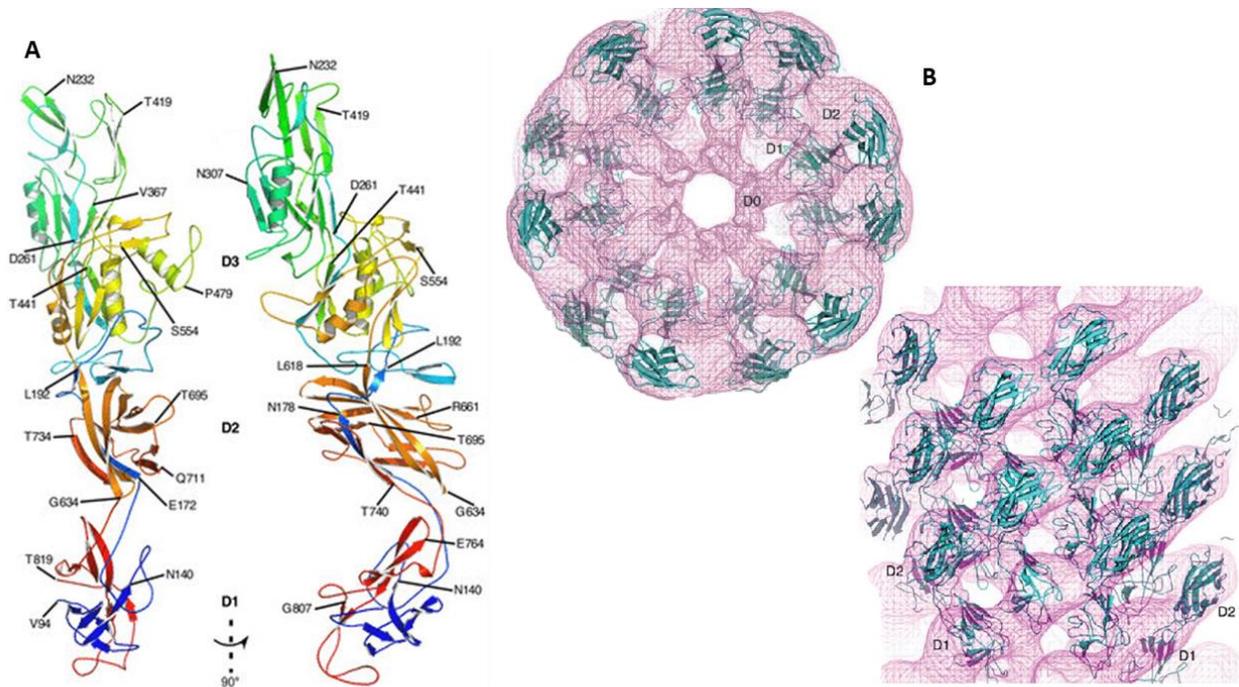


Figura 3. FlgE y gancho en *Salmonella*. A) Estructura tridimensional de FlgE. Se muestran los dominios D1, D2 y D3 de la proteína, así como los residuos importantes. B) Modelos moleculares de FlgE en un mapa de densidad. Se muestran los dominios de la proteína (Tomado de Samatey *et al*, 2004; Yoon *et al*, 2016).

Cuerpo basal

El cuerpo basal consiste en cuatro estructuras en forma de anillo montadas de manera coaxial. Se encuentra embebido dentro de la envoltura celular y es parte del motor del flagelo. Su estructura se compone del anillo C, anillo MS, el eje, y los anillos P y L (Figura 4). El anillo C está formado por tres proteínas: FliG, FliM y FliN, que se ensamblan alrededor de la cara citoplasmática del anillo MS. Su función reside en regular la frecuencia de inversión del motor y facilitar la exportación de las proteínas para el ensamblaje flagelar (Kawamoto y Namba, 2017).

Embebido a la membrana citoplasmática se localiza el anillo MS, el cual está compuesto de diversas copias de una sola proteína, FliF. Este anillo es el primer componente flagelar en acoplarse. De esta forma, actúa como la base para el ensamblaje flagelar, además de contener al aparato de exportación. Por otra parte, junto con el anillo C forma el rotor, donde la generación del torque se da a partir de las interacciones electrostáticas con el estator (Minamino y Namba, 2004).

Embebido sobre la parte superior del anillo MS se sitúa el eje flagelar. Esta estructura se compone de 4 proteínas diferentes; una distal (FlgG) y tres proximales (FlgB, FlgC y FlgF). La función del eje es transmitir el torque generado por el motor flagelar hacia el gancho y el filamento.

El anillo P se localiza dentro de la capa de peptidoglicano. Está formado por la proteína FlgI. Por otra parte, el anillo L se ubica en la membrana externa y está compuesto por la proteína FlgH. Se sabe que este anillo forma un poro que permite que el gancho y el filamento salgan de la envoltura celular. En conjunto, los anillos L y P forman una estructura que actúa como un buje molecular del eje flagelar, por lo que el complejo tiene una superficie lisa y es muy estable frente a una amplia variedad de tratamientos químicos (Akiba et al., 1991).

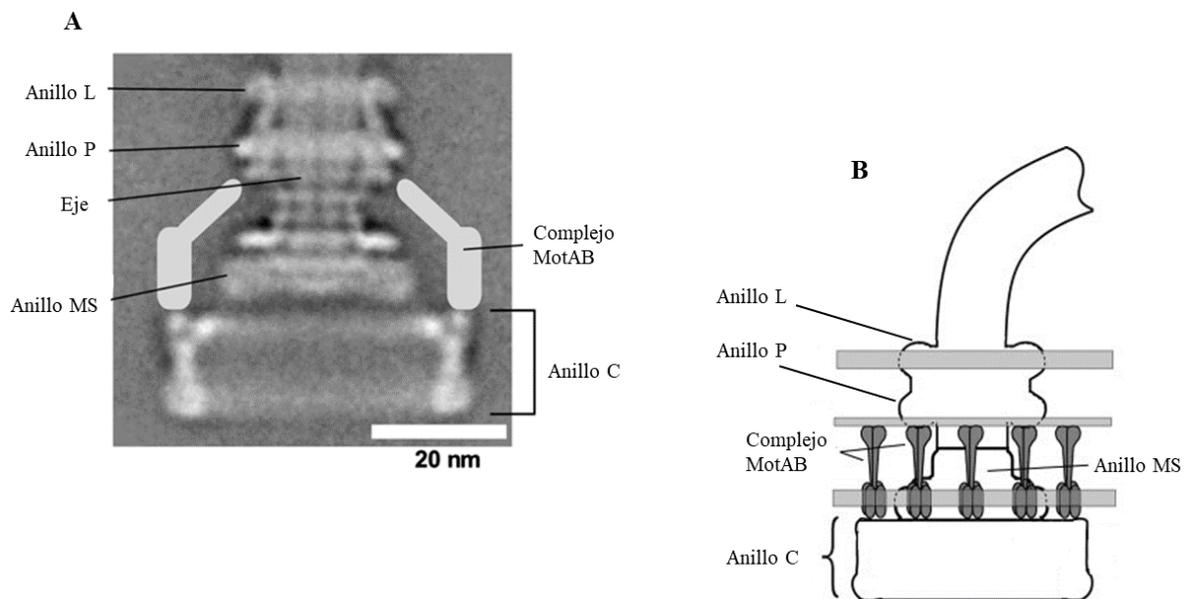


Figura 4. Componentes del cuerpo basal. A) Imagen por CryoEM del cuerpo basal purificado de *Salmonella*. Se observa la localización de los anillos y el eje. B) Esquema del cuerpo basal. Muestra los componentes principales, además del motor o complejo estator MotAB (Modificado de Nakamura y Minamino, 2019; Lowder *et al*, 2005).

Aparato de exportación

El aparato de exportación flagelar es un complejo multiproteico que se encuentra anclado a la membrana interna, ubicado dentro del anillo C y en la cara citoplásmica del anillo MS. El complejo se encuentra relacionado evolutivamente al sistema de secreción tipo III o inyectosoma, usado por bacterias patógenas para la secreción de factores de virulencia (Abby y Rocha, 2012).

Su función es la secreción de las proteínas flagelares, las cuales son sintetizadas en el citoplasma, por lo que deben ser enviadas hacia el espacio periplásmico, la membrana externa o el medio extracelular (Figura 5). Este sistema se compone de un canal de exportación formado por seis proteínas integrales de membrana: FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR; y un anillo de ATPasa citoplásmico estructurado por tres proteínas citoplásmicas solubles: FliJ, FliH y FliI (Fan y Macnab, 1996; Minamino et al., 2000; Minamino y Macnab, 2000). Se sabe que la estructura del complejo ATPasa es similar a las familias de ATPasas de rotación tipo F y tipo V, lo que sugiere que el aparato de exportación flagelar tiene un origen evolutivo común con este tipo de familias (Suzuki et al., 1998). Además de las proteínas antes mencionadas, se reconoce la existencia de cuatro proteínas citoplásmicas que funcionan como chaperonas de exportación flagelar, estas son: FlgN, FliA, FliS y FliT (Macnab, 2004a)

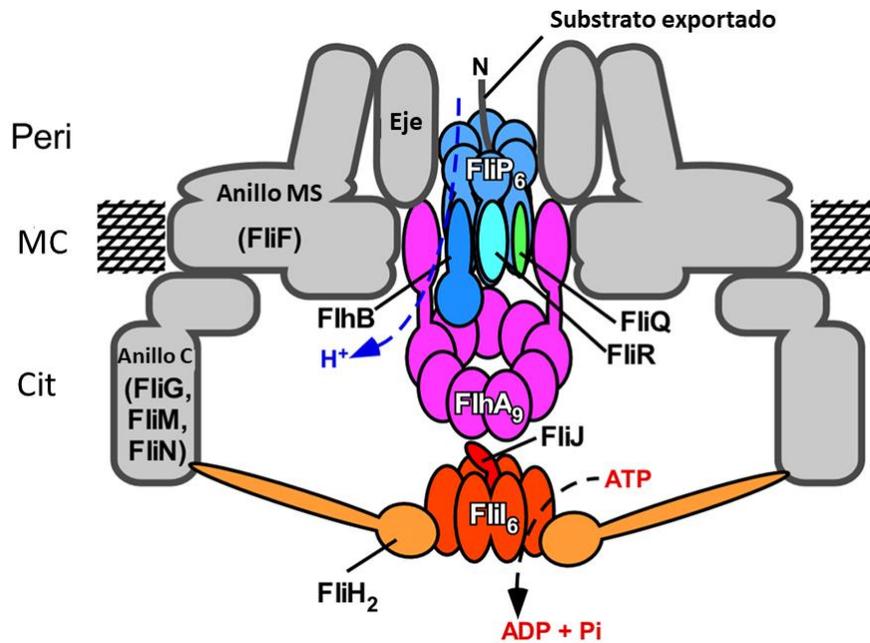


Figura 5. Aparato de exportación flagelar. Se esquematiza la exportación de un sustrato a través del sistema. Así como la función de ATPasa de FliI y el gradiente electroquímico de protones para conducir la exportación. MC: membrana citoplásmica; Cit: Citoplasma; Peri: Periplasma. Modificado de Minamino, 2018.

La proteína integral de membrana FlhA forma un homo-nonámero que actúa como un transductor de energía al asociarse con el anillo de ATPasa citoplásmico. Por otra parte, el carboxilo terminal de FlhA y FlhB se proyecta hacia la cavidad central del anillo C y forma una plataforma de anclaje para el anillo de ATPasa y para las chaperonas de exportación flagelar, además de mediar la selección y el transporte de proteínas para un ensamblaje eficiente de la estructura axial. Otro componente que se debe destacar es la proteína FliI, la cual forma un homo-hexámero que hidroliza ATP, ayudando en la exportación de los substratos flagelares (Minamino et al., 2011). Sin embargo, se ha reportado que FliI no es indispensable para la exportación, ya que la energía necesaria para este proceso se da por la fuerza protón-motriz (Minamino y Namba, 2008).

Sistema estator

El estator es una estructura fundamental del flagelo que, junto con el rotor, forma el motor flagelar. Este sistema está formado por las proteínas MotA y MotB o por PomA y PomB, dependiendo del ion utilizado (Figura 6). Para MotA y MotB, los iones de acoplamiento para generar el torque son H^+ , mientras que para el sistema PomA y PomB, el ion requerido es Na^+ . Los motores impulsados por H^+ se han descrito en *E. coli* y *S. enterica*, mientras que el motor impulsado por Na^+ se ha reportado en especies marinas del género *Vibrio* (Nishihara y Kitao, 2015a).

El estator provee el trabajo necesario para la rotación del flagelo a través de la transformación de la energía proveniente del gradiente electroquímico. MotA y MotB forman los canales iónicos que permiten el paso de los protones a través de la membrana (Nishihara y Kitao, 2015b). La proteína MotA muestra una estructura con 4 cruces transmembranales, dos asas periplásmicas y una gran región citoplásmica, en donde se encuentran los residuos Arg90 y Glu98. Por otra parte, la estructura de MotB se caracteriza por tener un cruce transmembranal y una región periplásmica. En su zona transmembranal se localiza un residuo Asp32, necesario para el paso de los protones a través del canal (Zhou, Lloyd, et al., 1998a). La región periplásmica de MotB es extensa y presenta un dominio de unión a peptidoglicano, el cual mantiene el estator anclado a la pared celular (Braun et al., 2004).

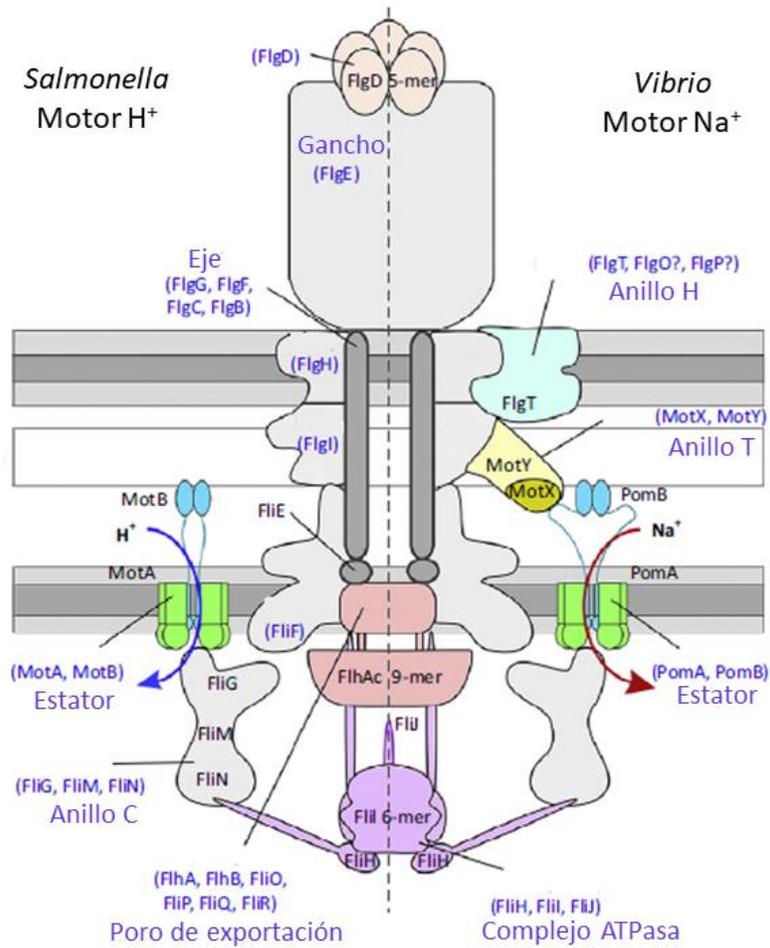


Figura 6. Esquema comparativo de los dos tipos de motores flagelares. Izquierda: se muestra el modelo del motor flagelar de *Salmonella*, un motor de protones (H^+). Derecha: motor flagelar de *Vibrio*, el cual es propulsado por iones Na^+ . Se observan las estructuras características de cada motor. Modificado de Minamino e Imada, 2015.

MotA y MotB forman un hetero-hexámero con estequiometría $MotA_4MotB_2$ (Figura 7) (Kojima & Blair, 2001; Yorimitsu et al., 2004). Sin embargo, recientemente se observó por un ensayo de Cryo-EM realizado en *Vibrio mimicus*, *Clostridium sporogenes* y *Bacillus subtilis* un complejo pentagonal del estator. Al realizar una reconstrucción tridimensional de los complejos, estos produjeron volúmenes que solo pueden interpretarse como estructuras con estequiometría $MotA_5MotB_2$ (Deme et al., 2020).

Existe un número variable de estatores dispuestos en la base del flagelo, así como un recambio continuo de éstos (Leake et al., 2006). Por otra parte, se ha reportado que el número de estatores en el flagelo está relacionado directamente con la velocidad de desplazamiento de la célula (Ryu et al., 2000; Yuan et al., 2009). Es decir, a mayor cantidad de estatores existentes, mayor torque y mayor velocidad.

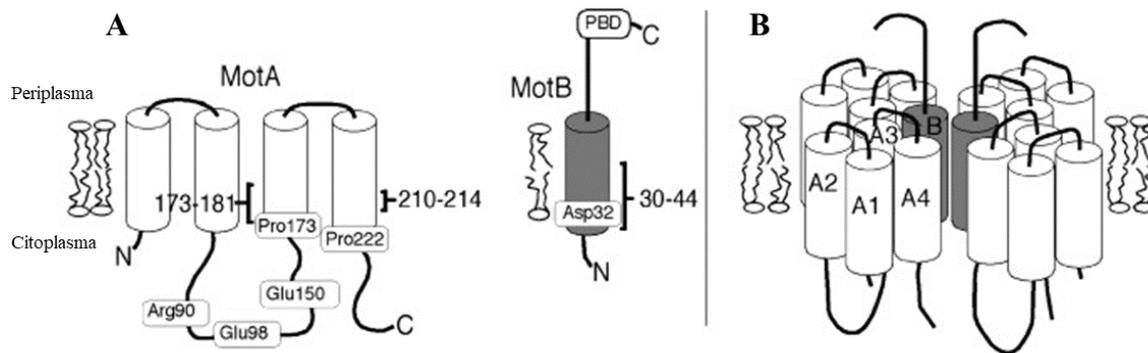


Figura 7. Complejo MotA/B. A) Se muestra la topología de membrana de las proteínas MotA y MotB, así como los residuos importantes implicados en la generación del torque. B) Se muestra el arreglo de las subunidades del complejo MotA/B, con estequiometría MotA₄MotB₂. Modificado de Braun *et al.*, 2004.

Como se mencionó anteriormente, el estator es el encargado de transformar la fuerza protón-motriz en energía para la rotación del flagelo. Para explicar cómo se da esta transformación, se han propuesto varios modelos. Sin embargo, el modelo más aceptado y con mayor evidencia experimental nos dice que la protonación del residuo Asp32 de MotB induce un cambio conformacional en MotA. Esto da paso a que los residuos citoplásmicos Arg90 y Glu98 de MotA interactúen de forma electrostática con los residuos cargados Asp289 y Arg281 de la región carboxilo terminal de FliG. Esta interacción permitiría la generación del torque mediante la repulsión de carga de los residuos (Zhou, Lloyd, et al., 1998b; Zhou, Sharp, et al., 1998) (Figura 8).

Recientemente se identificó una nueva proteína asociada al funcionamiento del motor flagelar, denominada FliL. Esta es una proteína transmembranal ampliamente conservada, cuya ausencia genera diferentes fenotipos con defectos en la motilidad. Estos defectos pueden ser una

deficiencia o inhibición del nado, una ineficiencia en el *swarming* o hasta defectos estructurales que comprometen la estabilidad estructural del flagelo (Lin et al., 2018). Sin embargo, la función específica de esta proteína no se ha dilucidado. Un estudio realizado en *E. coli* y *Salmonella* mostró que FliL aumenta la potencia del motor mediante el reclutamiento o estabilización de los estatores, incrementando la eficiencia de éstos, además de contribuir a la generación de torque en medios altamente viscosos (Partridge et al., 2015). Sin embargo, se han observado otros fenotipos de FliL, como en *Proteus mirabilis*, donde está involucrada en procesos energéticos de la función flagelar (Belas y Suvanasuthi, 2005); en *Borrelia burgdorferi* se ha visto que FliL asiste en la orientación periplásmica del flagelo (Motaleb et al., 2011); en *Caulobacter crescentus*, FliL está implicada en la rotación del motor (Jenal et al., 1994); y en *R. sphaeroides* se ha propuesto que está involucrada en la apertura del canal de protones del motor (Suaste-Olmos et al., 2010).

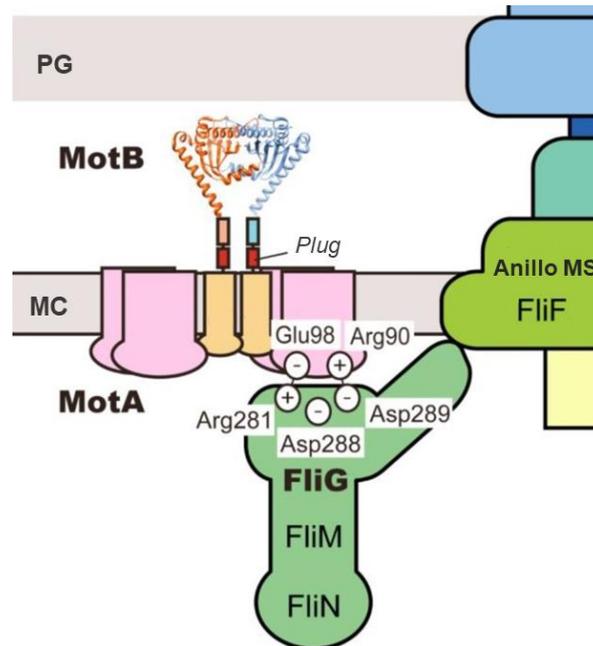


Figura 8. Esquema de la interacción rotor-estator. Las interacciones entre los residuos MotA-Arg90/FliG-289 y MotA-Glu98/FliG-Arg281 están involucradas en la generación del torque. Además de desempeñar un trabajo clave en el ensamblaje del estator. Modificada de Morimoto y Minamino, 2014.

Regulación transcripcional y biogénesis flagelar

La forma en la que se ensambla el flagelo sigue un proceso secuencial, ordenado y lineal. El ensamblaje comienza con los componentes citoplásmicos y periplásmicos para terminar con los componentes extracelulares. Este proceso está sumamente regulado y conservado entre las especies de bacterias. La secuencia correcta para el ensamblaje del flagelo está dada por la regulación en la expresión de los genes flagelares y por los cambios postraduccionales de los componentes de este organelo (Macnab, 2003).

Para llevar a cabo la síntesis del flagelo, es necesario que se expresen los genes contenidos en el regulón flagelar. En *E. coli* y *S. typhimurium*, estos genes se localizan en múltiples operones, los cuales son expresados en un sistema jerárquico que se ha dividido en tres clases transcripcionales: Clase I o tempranos, Clase II o intermedios y Clase III o tardíos. El proceso en sí implica un control positivo y negativo en todas las etapas del ensamblaje del flagelo, comenzando con la transcripción y terminando con la localización de las proteínas componentes del sistema flagelar (Osterman et al., 2015). El ensamblaje y funcionamiento del flagelo requiere de un alto costo energético y recursos significativos, por lo que las bacterias han desarrollado mecanismos para activar o inactivar la construcción de su flagelo dependiendo de las condiciones ambientales y de su propio desarrollo (Chilcott y Hughes, 2000).

En *E. coli* y *S. typhimurium*, la expresión de los genes flagelares Clase I (*flhDC*) forma el factor transcripcional FlhD₄C₂ que, junto al factor Sigma 70 (σ^{70}), activa la transcripción de los genes Clase II. Estos genes codifican para componentes del cuerpo basal y el gancho, además de la proteína reguladora FliA (σ^{28}) y su inhibidor FlgM (anti σ^{28}), los cuales controlan la expresión de los genes Clase III (Kutsukake et al., 1990). Los genes Clase III codifican para las proteínas de la flagelina (FliC), el *cap* (FliD), proteínas asociadas al gancho (FlgK y FlgL), proteínas del estator (MotA y MotB) y proteínas del sistema quimiotáctico (Figura 9). Cabe señalar que la expresión de los genes tardíos sólo puede iniciar después de la formación del cuerpo basal y el gancho (Zaslaver et al., 2004)

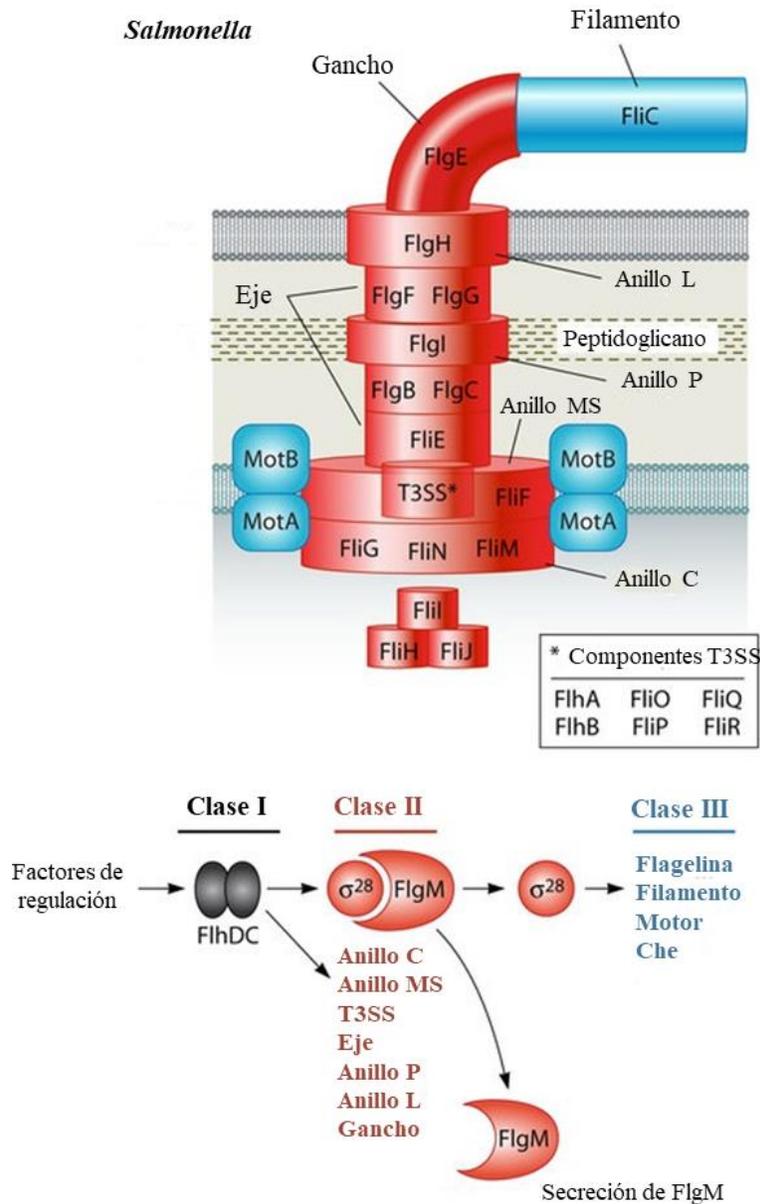


Figura 9. Regulación genética flagelar. Esquema de la regulación genética del flagelo en *Salmonella*. Las proteínas están codificadas por colores según la clase de genes que las codifican. Modificado de Gilbreath *et al*, 2011.

Como se mencionó anteriormente, el ensamblaje del flagelo se da a la par de su transcripción. Iniciando desde las partes proximales y terminando en las distales. De esta forma, la primera estructura es el anillo MS y el T3SS (Sistema de Secreción Tipo III). Posteriormente, en la sección citoplásmica del anillo MS, se ensambla el anillo C, el cual funciona como un receptor invertido para entregar proteínas de manera eficiente al aparato de exportación flagelar en el centro

del anillo de MS (Kubori et al., 1997; Macnab, 2003). Una vez formado el anillo C, se lleva a cabo el reclutamiento de las proteínas MotA y MotB para la formación del motor flagelar. Si bien, en la jerarquía transcripcional los genes *mot* se encuentran en la Clase III, las proteínas MotA y MotB son independientes del orden de ensamblaje del flagelo.

Una vez formado el T3SS, se facilita la exportación de la mayoría de las proteínas que se localizan más allá de la membrana interna, comenzando con las proteínas del eje. La formación del eje es sumamente importante, ya que por éste se lleva a cabo el transporte de las proteínas que conforman el gancho y el filamento. Su formación requiere de las proteínas FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ, siendo esta última importante, ya que lleva a cabo dos funciones en la construcción del eje. FlgJ actúa como una chaperona mediante la región amino-terminal, mientras que su región carboxilo-terminal tiene actividad de muramidasa. De esta forma, FlgJ degrada el peptidoglicano, lo que favorece el paso del eje (Macnab, 2004b; Saijo-Hamano et al., 2004). La formación del anillo P y anillo L depende de la presencia del eje. Estas estructuras anulares, a diferencia de las proteínas del eje, se secretan mediante la vía Sec. Su formación es importante, ya que mantienen la integridad del eje flagelar. Posteriormente, se da la formación del gancho. Esta estructura se compone de monómeros de FlgE y alcanza una longitud de 55 nm, aproximadamente. Como se mencionó anteriormente, para la polimerización de FlgE es necesaria la proteína FlgD, además de la presencia de FliK, la cual regula la longitud correcta de la estructura (Ferris y Minamino, 2006; Hirano et al., 1994, 2005)

Cuando se alcanza el tamaño normal del gancho, se da un cambio en la especificidad de la exportación de sustratos en el T3SS. Así, comienza la exportación de las proteínas FlgK, FlgL, FliD y FliC. Posteriormente, FlgD es reemplazada por FlgK y FlgL. Esto permite que FliD se ensamble sobre ellas y lleve a cabo la polimerización de FliC, formando el filamento (Evans et al., 2006; Homma y Iino, 1985; Macnab, 2003). Por último y no por ello menos importante, se ensamblan los componentes quimiotácticos.

Quimiotaxis

Como se mencionó en las secciones anteriores, la compleja maquinaria molecular que orchestra el desplazamiento de las bacterias les confiere una ventaja adaptativa *per se*, ya que son capaces de percibir los cambios en su exterior, y de esta forma, pueden responder a éstos.

Los grandes avances en biología molecular y bioinformática de las últimas décadas han permitido dilucidar el mecanismo por el cual las bacterias responden a los estímulos. Una de las principales formas es regulando su expresión génica, ya sea aumentando o disminuyendo la expresión de uno o varios genes. Por otra parte, existe un movimiento dirigido como respuesta hacia los estímulos externos, el cual se conoce como taxis. Dentro de esta categoría se encuentran múltiples movimientos que se han clasificado según el estímulo que las causa, como son: fototaxis, galvanotaxis, magnetotaxis, pH-taxis, quimiotaxis y termotaxis (Wadhams & Armitage, 2004). La quimiotaxis es el movimiento causado por estímulos químicos, ya sea atractores o repulsivos. Es la taxis más estudiada, por lo que se conoce a fondo el sistema regulador de dos componentes que controla la señalización y da paso al control de la motilidad. Este sistema consiste en un receptor membranal con un núcleo conservado que posee actividad de histidina-cinasa (HK) y una proteína citoplásmica que genera una respuesta (regulador de respuesta). Los estímulos ambientales son detectados por la HK que modula y transfiere el grupo fosfato al dominio receptor del regulador de respuesta citoplásmico. Éste contiene un residuo de aspartato, el cual es un aceptor del grupo fosfato. Lo anterior, causa una fosforilación que da como resultado una respuesta específica (Lukat y Stock, 1993).

En *E. coli* se ha descrito ampliamente el sistema quimiotáctico. Este sistema se compone por un sensor de histidina cinasa (CheA) y un regulador de respuesta (CheY). Los estímulos ambientales son detectados por proteínas quimiorreceptoras llamadas proteínas quimiotácticas aceptoras de metilo (MCP), las cuales están embebidas en la membrana citoplasmática. Un dominio sensorial N-terminal localizado en el periplasma, recibe señales que luego se transmiten al dominio de señalización C-terminal localizado en el citoplasma. Aquí, CheW funciona como una proteína enlazadora que conecta la histidina quinasa CheA con las MCP. Cuando se activa CheA, se autofosforila en un residuo de histidina conservado y, a su vez, fosforila a su regulador de respuesta CheY. CheY fosforilado (CheY-P) difunde libremente a través del citoplasma y se une a FliM, lo que produce un cambio en la dirección de rotación del motor. La señal se termina cuando CheZ desfosforila a CheY-P (Hazelbauer et al., 2008; Ottemann et al., 1998, 1999; Stock y da Re, 2000) (Figura 10).

Por otra parte, el sistema quimiotáctico posee una estrategia de adaptación que le permite desensibilizar el sistema ante una concentración de quimioefector dada. Este proceso se regula

mediante los estados de metilación y desmetilación de los MCP dados por las proteínas CheB y CheR, las cuales funcionan como metilesterasa y metiltransferasa, respectivamente (Xin y Othmer, 2012).

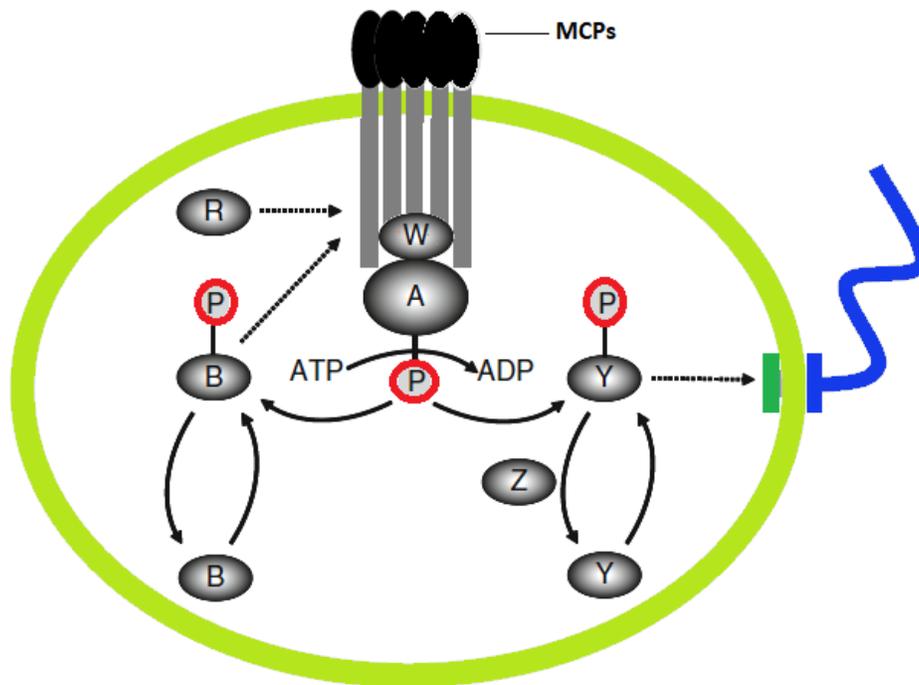


Figura 10. Esquema de la vía de señalización quimiotáctica de *E. coli*. Las proteínas receptoras de metilo (MCP) traducen señales de quimioefectores en el espacio periplásmico, modulando así la actividad de la histidina cinasa (Che), que está unida a las MCP por CheW. CheA fosforila a los reguladores de respuesta CheB y CheY cuyas formas fosforiladas interactúan con los MCP y el motor flagelar, respectivamente. CheR también interactúa con los MCP, mientras que la desfosfatasa CheZ desfosforila a CheY. Modificada de Miller *et al*, 2009.

Rhodobacter sphaeroides

El modelo de estudio utilizado en este trabajo fue *R. sphaeroides*, una bacteria púrpura no sulfurosa perteneciente a las α -proteobacterias. Este microorganismo tiene una gran plasticidad metabólica que le permite crecer en diversos ambientes y condiciones nutricionales. Su metabolismo puede cambiar de aeróbico a fotosintético o adaptarse a una respiración anaeróbica o fermentativa. Esta versatilidad lo convierte en un candidato potencial en aplicaciones de biorremediación. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en muchas de sus

capacidades adaptativas están lejos de entenderse (Kiley y Kaplan, 1988; Martínez-Luque et al., 1991; Schultz y Weaver, 1982).

El genoma de la cepa WS8N de *R. sphaeroides* consta de dos cromosomas (CI: 3.14 Mpb y CII: 0.97 Mpb) y cinco plásmidos. Esta bacteria posee dos conjuntos de genes flagelares: *fla1* y *fla2*, los cuales codifican flagelos completamente funcionales. La mayoría de estos genes están agrupados en *loci* separados dentro del CI. La organización de los genes *fla1* muestra similitudes con conjuntos de genes flagelares de otras bacterias como *E. coli* y *Salmonella*, mientras que en los genes *fla2* se observa un arreglo aleatorio de los genes, como lo que se ha reportado en *Bradyrhizobium japonicum* y *Helicobacter pylori* (Aizawa, 2014). El conjunto de genes *fla1* codifica para un único flagelo subpolar, mientras que *fla2* da origen a múltiples flagelos polares (Figura 11). A través de un análisis filogenético se logró identificar que Fla1 fue adquirido a través de un evento de transferencia horizontal de un ancestro de las γ -proteobacterias, mientras que el sistema Fla2 es propio del linaje de las α -proteobacterias. Este último sólo se ha detectado en cepas carentes del activador principal de los genes *fla1* que adquieren una ganancia de función por una mutación espontánea (Poggio et al., 2007).

El conjunto de genes *fla1* se expresa bajo condiciones estándar de crecimiento en el laboratorio, mientras que los genes *fla2* se mantienen inactivos. Ambos sistemas flagelares no se expresan al mismo tiempo en la célula, es decir, son mutuamente excluyentes. Por otra parte, se desconoce todavía el mecanismo que permite la expresión de *fla2* de manera natural (Vega-Baray et al., 2015).

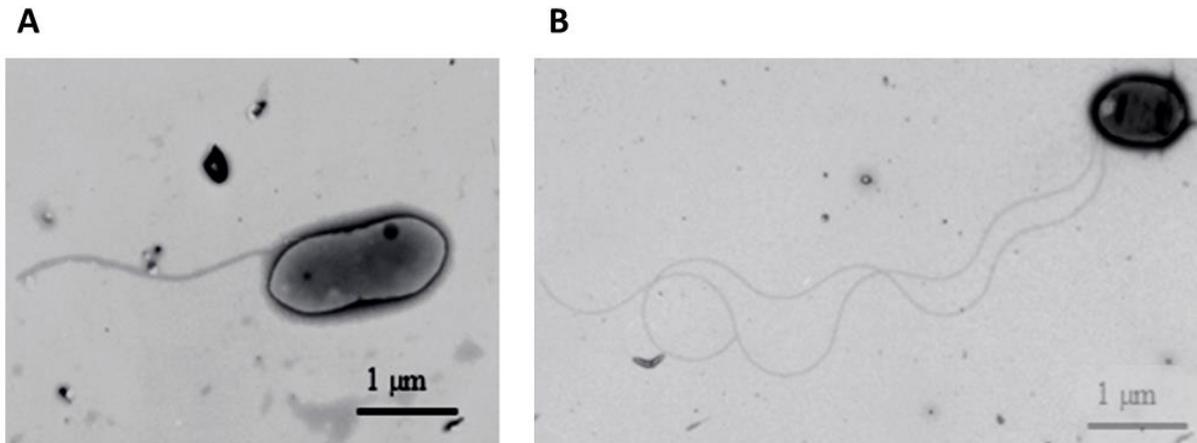


Figura 11. Sistemas flagelares de *R. sphaeroides*. Microscopía electrónica de A) la cepa silvestre WS8N con un único flagelo subpolar correspondiente al sistema Fla1, y B) la cepa AM1 con dos flagelos polares correspondientes al sistema Fla2. Tomada de Aizawa, 2014.

La regulación genética del sistema Fla1 sigue un patrón de expresión jerárquico que consta de IV clases. En la clase I se encuentra el gen *fleQ*, que codifica para el regulador maestro FleQ, un activador transcripcional que forma un complejo con el factor σ^{54} , lo que permite la expresión de los genes clase II. En esta clase se encuentran los genes *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliJ*; que dan origen a las proteínas del anillo MS y a algunos elementos del aparato de exportación; y el activador transcripcional FleT. Este último es de suma importancia ya que interactúa con FleQ para activar la transcripción de los genes clase III. Los genes clase III codifican para los productos necesarios en la formación del eje, el gancho y de los elementos restantes del aparato de exportación, además del factor σ^{28} (FliA) y anti σ^{28} (FlgM). La unión de FlgM con FliA bloquea la expresión de los genes clase IV hasta que el gancho está completamente ensamblado. Finalmente, la expresión de los genes clase IV necesita de la activación de σ^{28} . Para esto, se requiere que se libere FlgM al medio extracelular. Una vez liberado, el factor σ^{28} da lugar a la expresión de los genes *fliC*, *fliD* y *fliS* (Peña-Sánchez et al., 2009b; Poggio et al., 2005). Cabe señalar que FleQ también permite la expresión de los genes codificantes para las proteínas quimiotácticas, comenzando por la expresión del receptor citoplásmico *tlpT* y el sistema de transducción que incluye a *cheA4* y *cheA3*, *cheW4*, *cheR3*, *cheB2* y *cheY6* (Hernandez-Valle et al., 2017; Martin et al., 2006).

Planteamiento del Problema

Durante el transcurso del estudio flagelar, la mayoría de los trabajos se han centrado en modelos como *E. coli* y *Salmonella*, por lo que la investigación sobre la regulación genética, ensamblaje y funcionamiento del flagelo en otros modelos bacterianos como *R. sphaeroides* resulta relevante. A través del estudio del sistema flagelar de esta bacteria, se han observado diferencias substanciales con respecto a los modelos canónicos. Un ejemplo de esto es el motor de *R. sphaeroides*, el cual no es reversible, ya que sólo rota en sentido de las manecillas del reloj (CW) y se detiene completamente permitiendo el redireccionamiento de la bacteria por movimiento Browniano (Armitage & Macnab, 1987).

Como se mencionó anteriormente, *R. sphaeroides* tiene dos conjuntos de genes flagelares, Fla1 y Fla2, siendo Fla1 el más estudiado hasta la fecha. Si bien, la mayoría de los genes flagelares de este sistema codifican para proteínas con función conocida, aún quedan marcos de lectura abierta (ORFs) que no han sido caracterizados y, por tanto, se desconoce su papel en el funcionamiento o regulación flagelar. Este es el caso de RSP6090 y RSP0038.

Mediante análisis bioinformáticos sabemos que el ORF RSP6090 está constituido por 486 pb y sintetiza una proteína hipotética de 161 aa, mientras que el ORF RSP0038 consta de 189 pb que se traducen en una proteína hipotética de 62 aa. Ambos ORFs no han sido caracterizados a la fecha y no existen antecedentes de su estudio en la literatura, sólo sus secuencias y su ubicación en el genoma de la especie bacteriana. Por este motivo, en este proyecto se pretende aportar información sobre el fenotipo y posible participación de RSP6090 y RSP0038 en la motilidad de *R. sphaeroides*.

Hipótesis

Los marcos de lectura abiertos RSP6090 y RSP0038 codifican para proteínas flagelares pertenecientes al sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*, las cuales son necesarias para la correcta rotación y desplazamiento de la célula.

Objetivos

Objetivo general

- Describir y analizar los fenotipos de las proteínas codificadas por los marcos de lectura abiertos RSP6090 y RSP0038 dentro del funcionamiento del sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*.

Objetivos particulares

- Determinar el fenotipo de una mutante en RSP6090 sobre el fondo genético silvestre de *R. sphaeroides* WS8N.
- Determinar el fenotipo de una mutante en RSP0038 sobre el fondo genético silvestre de *R. sphaeroides* WS8N.
- Realizar una mutante de RSP0038 sobre el fondo genético de la mutante RSP6090 para obtener una doble mutante y analizar su fenotipo.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

En la tabla 1 se muestran las cepas bacterianas usadas en este trabajo. Las cepas de *R. sphaeroides* fueron cultivadas en medio Sistrom (Sistrom, 1960) utilizando dos condiciones diferentes: con iluminación constante de 6 focos de 40W a temperatura ambiente o en oscuridad a 30°C con agitación orbital a 250 rpm. En algunos protocolos modificamos este medio de cultivo; quitando el ácido succínico y los casaminoácidos, formando el medio -Sux. Cuando fue necesario, añadimos antibióticos al medio en las siguientes concentraciones: Ácido nalidíxico (Nal) [20µg/mL], Espectinomicina (Spc) [50µg/mL], Cloranfenicol (Cm) [3µg/mL] y Tetraciclina (Tc) [1µg/mL].

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i>		
S17	<i>recA endA thi hsdR</i> RP42 Tc::Mu::Tn7	Simon et al., 1983
Top10	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacx74</i>	Invitrogen
<i>R. sphaeroides</i>		
WS8N	Cepa silvestre; Nal ^r	
6090	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> ; Spc ^r	Este trabajo
0038	WS8N orf_0038:: <i>aadA</i> ; Spc ^r	Este trabajo
DM	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> orf_0038:: <i>cm</i> ; Spc ^r Cm ^r	Este trabajo
6090C	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> pRK415/orf_6090	Este trabajo
0038C	WS8N orf_0038:: <i>aadA</i> pRK415/orf_0038	Este trabajo
DMC	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> orf_0038:: <i>cm</i>	Este trabajo
	pRK415/orf_6090+orf_0038	Este trabajo
6090+MotAB	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> pRK415/MotA/MotB	Este trabajo
0038+MotAB	WS8N orf_0038:: <i>aadA</i> pRK415/MotA/MotB	Este trabajo
DM+MotAB	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> orf_0038:: <i>cm</i>	Este trabajo
	pRK415/MotA/MotB	

WS8N+MotAB	Cepa silvestre; pRK415/ <i>motAmotB</i> /; Nal ^r , Tc ^r	Este trabajo
6090+FliL	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> pRK415/ <i>fliL</i> /; Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0038+FliL	WS8N orf_0038:: <i>aadA</i> pRK415/ <i>fliL</i> /; Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
DM+FliL	WS8N orf_6090:: <i>aadA</i> orf_0038:: <i>cm</i> pRK415/ <i>fliL</i> /; Spc ^r , Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (Bertani, 1951) a 37°C en oscuridad (medio sólido) o con agitación orbital a 250 rpm (medio líquido). Cuando fue necesario, agregamos antibióticos en las concentraciones siguientes: Spc [50µg/mL], Tc [25µg/mL], Amp [200µg/mL].

Cabe señalar que los medios de cultivo fueron esterilizados por vapor a presión utilizando un autoclave; a una temperatura de 121°C durante 20 min. Sólo para el medio Sistrom se ajustó el pH a 7.0 con KOH y se agregó una solución de vitaminas (Tabla 2) en concentración 1:1000 al finalizar el proceso.

Tabla 2. Solución de vitaminas para medio Sistrom

Compuesto	Concentración
Ácido nicotínico	1%
Tiamina	0.5%
Biotina	0.01%

Plásmidos y oligonucleótidos

Utilizamos distintos plásmidos y oligonucleótidos durante la elaboración de este proyecto, los cuales se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos

Plásmido	Características	Referencia
pRK415	Vector de expresión para <i>R. sphaeroides</i> . Promotor <i>lac</i> ; Tc ^r ; 10690 pb	(Keen et al., 1988)
pJQ200MP18	Vector suicida para reemplazo de genes. Gm ^r ; 4700 pb	(Quandt y Hynes, 1993)
pTZ19R	Vector de clonación y secuenciación. Contiene <i>lacZ</i> ; Amp ^r ; 2863 pb.	(Mead et al., 1986)
pRK415/6090	Contiene el ORF RPS6090. Tc ^r .	Este trabajo

pRK415/0038	Contiene el ORF RSP0038. Tc ^r .	Este trabajo
pRK415/6090+0038	Contiene la secuencia de RSP6090 y RSP0038. Tc ^r .	Este trabajo
pJQ200MP18/0038	Porta el ORF RSP0038. Gm ^r .	Este trabajo
pRK415/ <i>motA motB</i> /	Contiene la secuencia codificante para las proteínas Mot. Tc ^r .	Este trabajo
pRK415/ <i>fliL</i> /	Contiene la secuencia codificante de FliL. Tc ^r	Este trabajo
Oligonucleótidos		
FwMotAB	5' CGAAAGCTTGGCCCCGAGATCCGGAGGAC3'	Este trabajo
RvMotAB	5'CGAGAATTCGCGTCTTATTCCGCAAAGCG3'	Este trabajo

Interrupción de RSP6090 y RSP0038

A partir del genoma de *R. sphaeroides* WS8N, se llevó a cabo la amplificación de RSP6090 y RSP0038. Se amplificó 150 pb río arriba de RSP6090 y 100 pb río abajo de RSP0038, usando los oligonucleótidos FW-HindIII y RV-EcoRI. El producto de PCR RSP6090_RSP0038 (980 pb) se clonó por separado en el vector pRK415, con el fin de utilizarlo en los ensayos de complementación. La secuencia de RSP6090 contenía un único sitio de restricción para AscI, mientras que RSP0038 mostraba un sitio único de corte para SacI; ambos sitios localizados cerca de la mitad de la secuencia codificante de cada gen. Una vez clonado, el vector fue digerido por separado con AscI y SacI para insertar un cassette de resistencia a espectinomicina. Posteriormente, las construcciones con los genes ya interrumpidos se subclonaron en el vector pJQ200MP18 y, por medio de una conjugación, se introdujeron los genes mutantes en la cepa WS8N. Las exconjugantes se seleccionaron por su resistencia a espectinomicina.

Complementación de las mutantes

Para complementar las mutantes se clonaron los fragmentos de RSP6090 y RSP0038 por separado en el vector pRK415. La construcción se introdujo por conjugación a las cepas mutantes respectivas. Las transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a tetraciclina.

Ensayo de motilidad

Se realizaron dos ensayos de motilidad distintos, con el fin de observar el fenómeno del nado de manera poblacional e individual. Para esto, llevamos a cabo los siguientes protocolos:

Placas de nado – Observación poblacional

Para las placas de nado fue necesario colocar cultivos líquidos en condiciones fotoheterotróficas en viales de 550 µL de las cepas de interés de *R. sphaeroides* una noche antes de

comenzar el ensayo. Las cajas de nado se prepararon con medio Sistro sin ácido succínico (-Sux), agar con una concentración de 0.25%, 0.30% y 0.35%, y propionato de sodio 100 μ M como quimioatrayente. Se inocularon 2 μ L del cultivo crecido durante la noche en cada caja Petri. Finalmente, las cajas se incubaron a 30°C durante 48 horas. Se procesaron los datos cada 24 horas con una cámara digital Panasonic[®] DMC-ZS10, modo B/N, ISO 200 y un tiempo de exposición de ½ s. Se midieron los halos de nado con el programa ImageJ.

Microscopia de campo oscuro – Observación individual

Para este protocolo, se colocaron cultivos líquidos de 13.5 mL en condiciones fotoheterotróficas de las cepas de interés de *R. sphaeroides*. Estos cultivos se prepararon con medio Sistro sin ácido succínico (-Sux) adicionado con caseína hidrolizada a una concentración de 2 g/L, vitaminas y antibióticos específicos para cada cepa. Se incubaron a 30°C por una noche. Para comenzar la observación, los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD_{600nm})=0.4. El desplazamiento de las bacterias se evaluó mediante microscopía de campo oscuro a partir de una muestra de 2 μ L. Los datos se registraron mediante grabaciones de 5s, usando una cámara de vídeo Canon[®] HV20 equipada con un cassette Sony[®] Professional Standard Mini DV (DVM63). Posteriormente, se realizó una digitalización de los videos para su análisis con el programa *CellTrack by Motion Analysis*[®]. En éste, se midió la velocidad de nado de las cepas y el número de paros por segundo.

Construcción de doble mutante

Con el fin de obtener una doble mutante, se realizó la interrupción de RSP0038 con un cassette de resistencia a cloranfenicol sobre el fondo genético de la mutante 6090. Para esto, utilizamos la construcción pJQ200MP18/0038::Cm/. Ésta fue introducida en *E. coli* S17-1 mediante transformación. Las células transformadas se seleccionaron mediante su resistencia a gentamicina y cloranfenicol. Posteriormente, se llevó a cabo una conjugación entre *E. coli* S17-1 transformada y *R. sphaeroides* mutante 6090. Las células exconjugantes se seleccionaron mediante un medio de selección que contenía sacarosa y cloranfenicol.

Complementación de la doble mutante

Para realizar la complementación de la doble mutante, previamente se llevó a cabo la construcción del vector pRK415/6090+0038/. Este vector fue introducido en *E. coli* S17-1 por transformación. Posteriormente, la construcción fue introducida en la doble mutante mediante conjugación. Las exconjugantes fueron seleccionadas por su resistencia a la tetraciclina.

Construcción de pRK415/MotA_MotB

La construcción pRK415/MotA_MotB se obtuvo clonando *motA* y *motB* en el vector pRK415. Lo anterior se llevó a cabo amplificando las secuencias de *motA* y *motB* mediante PCR, usando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 3. La secuencia amplificada incluye las secuencias codificantes para *motA_motB* y 140 pb y 80 pb río arriba y río abajo, respectivamente. El producto de 2100 pb se subclonó en el vector pTZ19R para su mantenimiento. Posteriormente, se digirió y clonó en el vector pRK415 para su expresión.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción de ligación

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador TC-512 Techne, utilizando la enzima Taq-polimerasa. Se llevaron a cabo 26 ciclos de amplificación y 3 ciclos iniciales. Para la clonación, se usó la ligasa T4-DNA. Las reacciones con esta enzima se llevaron a cabo en incubaciones de toda la noche a 16°C.

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se realizó el método de electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos de DNA de interés. Los geles se prepararon con una concentración de 1% de agarosa. Éstos se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal con buffer TE (Tris-base 40 mM, ácido acético 32 mM, acetato de sodio 2 mM, EDTA 1mM) a 80 V durante 1 hora, aproximadamente. Al finalizar, el gel se incubó en bromuro de etidio por 20 minutos para poder observar el resultado colocando el gel bajo luz UV.

Digestiones con endonucleasas

La digestión del DNA se llevó a cabo usando endonucleasas de tipo II. Los vectores pTZ19R, pJQ200MP18 y pRK415 se digirieron con HindIII y EcoRI (*Promega, New England Biolabs*). Se usaron las enzimas de restricción AscI y SacI para digerir las secuencias de RSP6090 y RSP0038, respectivamente.

Transformación en *E. coli*

Para llevar a cabo el protocolo de transformación, se creció un cultivo de 10 mL de *E. coli* Top10 o S17-1 hasta una densidad óptica (OD_{550nm})=0.5. Posteriormente, se centrifugó a 4355 X g durante 7 minutos a 4°C para separar las células del medio líquido. El paquete celular obtenido se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 100 mM estéril y se incubó en hielo por 20 minutos. Después, se volvió a centrifugar bajo las condiciones antes mencionadas. Esta vez el paquete celular resultante

se resuspendió con 666 μL de CaCl_2 y se incubó en hielo durante 45 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se colocaron 200 μL de las células competentes en viales de 1.5 mL y se añadieron 2 μL del DNA de interés. Los microtubos se incubaron durante 1 hora en hielo. Inmediatamente después se incubaron a 42 °C por 2 minutos para después colocarlos en hielo durante 5 minutos. Enseguida, se les añadieron 800 μL de LB y se incubaron a 37°C por 1 hora. Finalmente, se tomaron 150 μL de células y se sembraron en cajas de medio LB selectivo, éstas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Conjugación

Para este protocolo se colocaron cultivos de *E. coli* y *R. sphaeroides* de 2 y 10 mL, respectivamente, y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 100 μL del cultivo de *E. coli* en 10 mL de medio LB y se incubó en agitación hasta una densidad óptica ($\text{OD}_{550\text{nm}}$)=0.5. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1500 μL de cada cultivo, se colocó en dos microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 3000 X g durante 6 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió con 500 μL de LB y nuevamente se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas. Una vez terminada la centrifugación, se resuspendieron los *pellets* resultantes en 500 μL de medio LB y se mezclaron las cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides*. Posteriormente se centrifugó a 3000 G durante 6 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en 70 μL de LB. La mezcla se colocó en una caja Petri con medio LB, sobre un recuadro estéril de nitrocelulosa de 1.0 x 1.0 cm, aproximadamente. La caja se incubó a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente, se recuperó el recuadro de nitrocelulosa, se colocó en un microtubo de 1.5 mL, se añadió 1 mL de medio LB y se agitó vigorosamente la muestra para desprender las células de la nitrocelulosa. Finalmente, el líquido homogenizado se sembró en un medio de selección.

Resultados

Análisis bioinformáticos

Con el fin de obtener más información sobre los ORFs RSP6090 y RSP0038, llevamos a cabo distintos análisis bioinformáticos. El primer paso fue un PSI-BLAST con el objetivo de encontrar homólogos para las proteínas codificadas por los ORFs estudiados en este trabajo. Para RSP6090 realizamos dos iteraciones: en la primera, la mayoría de los homólogos fueron proteínas hipotéticas pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae; la segunda iteración alineó también a la proteína FliL de especies de gammaproteobacteria, lo que podría sugerir que RSP6090 es un homólogo distante de FliL. Para RSP0038, todos los homólogos están anotados como proteínas hipotéticas pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae. Posteriormente, decidimos revisar el arreglo genético de los homólogos encontrados. Observamos que el contexto genético es bastante similar al del operón que contiene a RSP6090 y RSP0038, por lo que podemos decir que se encuentran conservados en la familia Rhodobacteraceae (Figura 12).

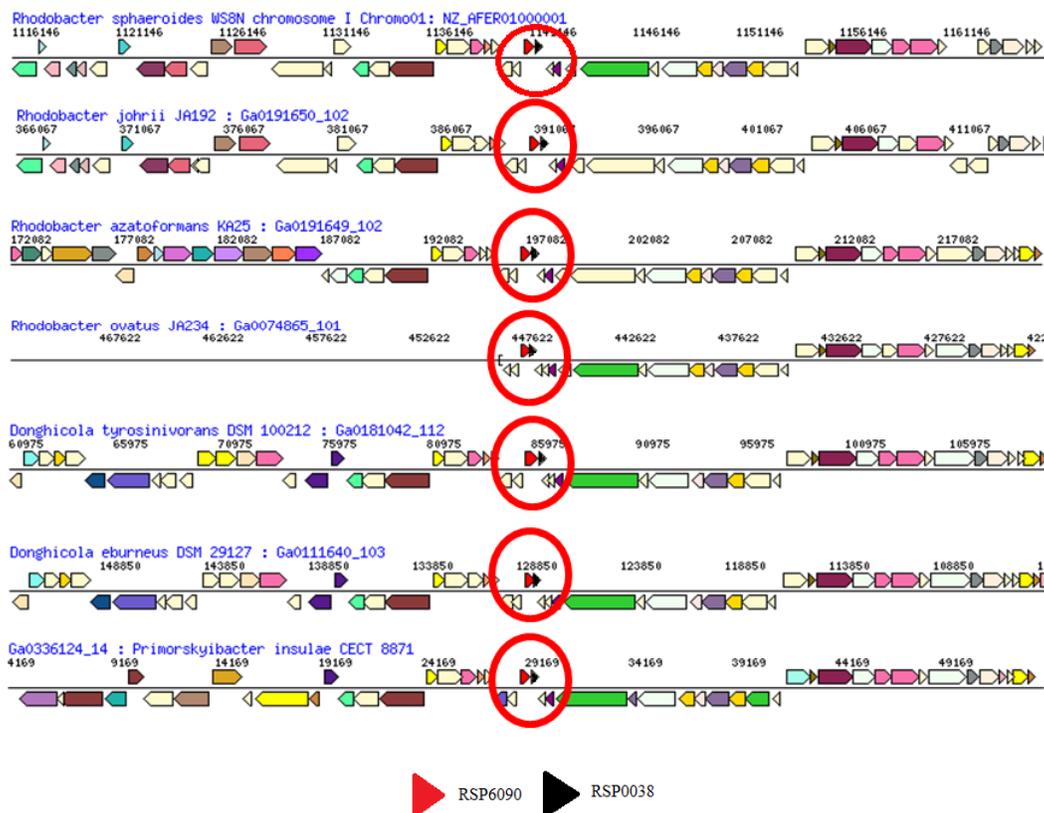


Figura 12. Contexto genético de los homólogos de RSP6090 y RSP0038. Se encerró en color rojo a los genes homólogos de RSP6090 y RSP0038. Se utilizó la base de datos IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) para realizar la búsqueda.

Después, llevamos a cabo una predicción de la estructura terciaria para RSP6090 y RSP0038 a través de AlphaFold 2.0 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=33g5Ilegij5R>) y SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). En este último, para RSP6090 se obtuvo una estructura muy similar a la proteína FliL de *Vibrio alginolyticus* (FliL_{Va}), elucidada recientemente con una resolución de 3.4 Å (Takekawa et al., 2019) y al cristal de FliL de *Helicobacter pylori*, con una identidad de 21.10 y 15.63, respectivamente. Para RSP0038, no se encontró una estructura similar.

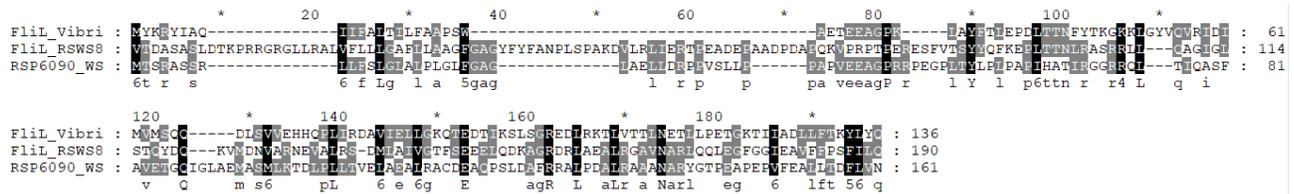


Figura 13. Alineamiento de RSP6090. Se muestra el alineamiento de RSP6090 con FliL_{Va} y FliL_{Rs}. En negro, se marcan los aminoácidos conservados en las tres secuencias; en gris, se observan los residuos conservados sólo entre dos secuencias.

Cuando probamos con AlphaFold 2.0, se generó una estructura *de novo* para RSP6090 que consiste en una hélice transmembranal, un conector, tres α -hélices y una lámina β compuesta por cuatro hebras β (Figura 14A). Esta estructura es bastante similar a la reportada en el cristal para FliL de *V. alginolyticus*, en donde se muestra un conector, cuatro α -hélices y una lámina β compuesta por cuatro hebras β (Figura 14B). Para RSP0038, la predicción de estructura terciaria arrojada por AlphaFold 2.0 mostró una estructura compuesta por una α -hélice en el extremo C-terminal, antecedido de una lámina β compuesta por dos hebras β , y una región desordenada hacia el N-terminal, que el programa no pudo resolver (Figura 14C). Cabe señalar que este programa compara, mediante aprendizaje profundo y haciendo uso de una red neuronal artificial, estructuras y secuencias de aminoácidos de miles de proteínas cristalizadas y, a partir de esa comparación, es capaz de predecir la estructura de proteínas desconocidas a partir de su secuencia.

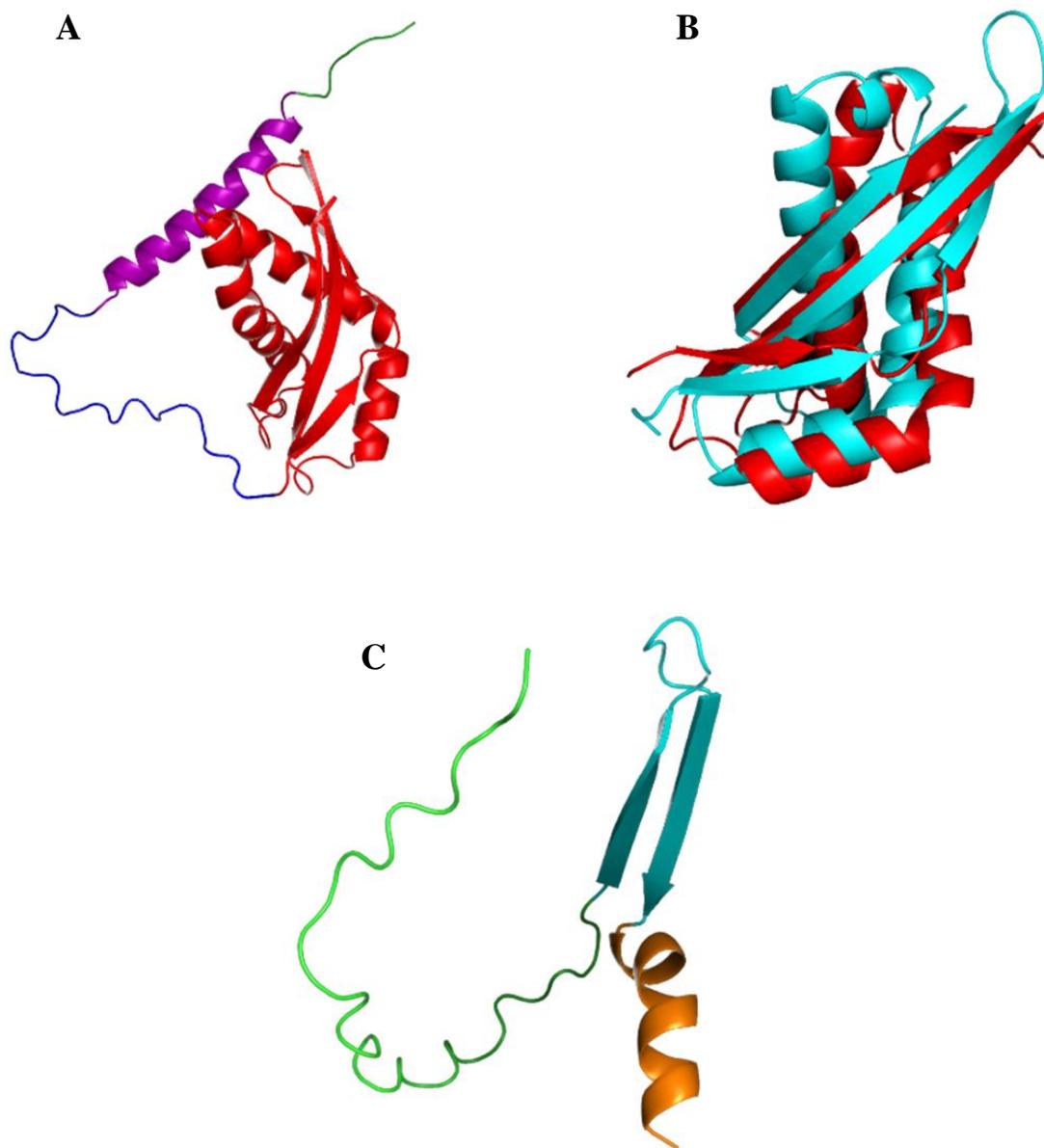


Figura 14. Predicción de estructura terciaria de las proteínas hipotéticas. A. Estructura terciaria predicha para RSP6090. Morado: hélice transmembranal; azul: conector; rojo: dominio de FliL. B. Sobreposición del dominio FliL de RSP6090 (rojo) con el cristal de FliL_{Va} (cian). Se observan diferencias puntuales entre las estructuras. C. Predicción de la estructura terciaria de RSP0038. En color anaranjado: α -hélice; azul: lámina β ; verde: región desordenada.

Por otra parte, realizamos una reconstrucción filogenética con las secuencias de FliL de las especies α -proteobacterias que presentaron homología con RSP6090 y con las secuencias homólogas a la misma proteína. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con Mesquite

3.6, usando MUSCLE. El árbol filogenético mostrado fue inferido usando el método de máxima verosimilitud. Observamos que el árbol se divide en dos grandes grupos: el grupo de RSP6090 y el grupo de FliL. Cabe recordar que las secuencias homólogas para RSP6090 sólo se encontraron en un pequeño grupo de bacterias de la familia Rhodobacteraceae (Figura 15).

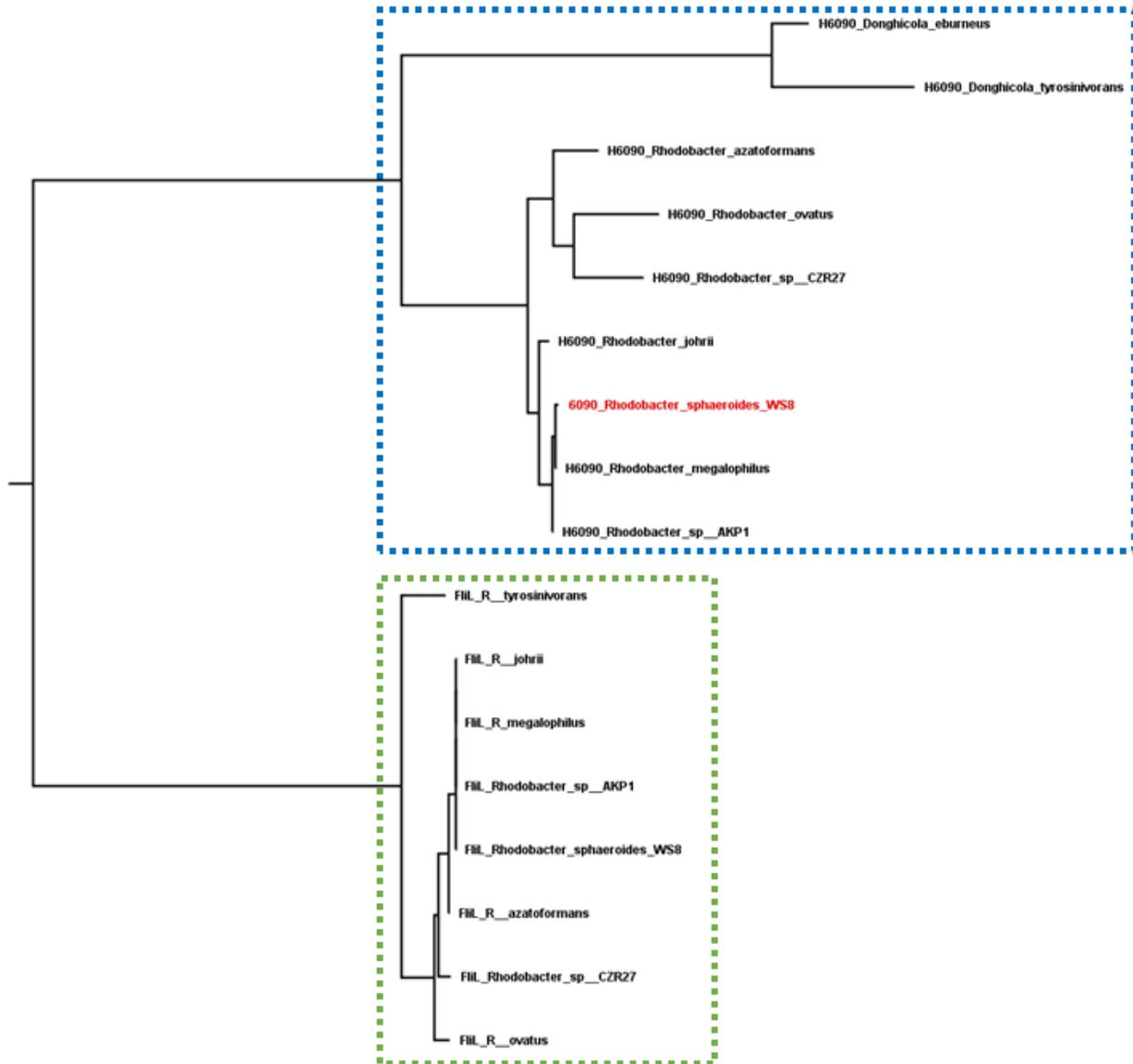


Figura 15. Análisis filogenético de las especies que presentan la secuencia homóloga de RSP6090. El árbol se divide en dos grupos. Azul: Grupo RSP6090; Verde: Grupo FliL. Marcado con rojo, se encuentra RSP6090. H6090: se refiere a las secuencias homólogas para RSP6090.

En el genoma de *R. sphaeroides* WS8N, las proteínas codificadas por RSP6090 y RSP0038 están anotadas como hipotéticas, por esta razón llevamos a cabo una predicción de la topología de las proteínas mediante el servidor de *TOPCONS* (<https://topcons.cbr.su.se/pred/>). Para RSP6090, los resultados difieren debido a los distintos métodos que emplea el servidor, pero el consenso muestra una proteína principalmente extracelular con la presencia de un cruce transmembranal o una secuencia señal entre los residuos 10 a 30 (Figura 16A). Debido a esto, decidimos usar el servidor *TMHMM* v2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) el cual predice que la proteína posee una hélice transmembranal entre los residuos 7 a 29 y una posible secuencia señal en el extremo N-terminal (Figura 16B). Por otra parte, al analizar la secuencia de RSP0038, el servidor sólo nos indicó que es una proteína sin hélice transmembranal ni secuencia señal, probablemente citoplásmica.

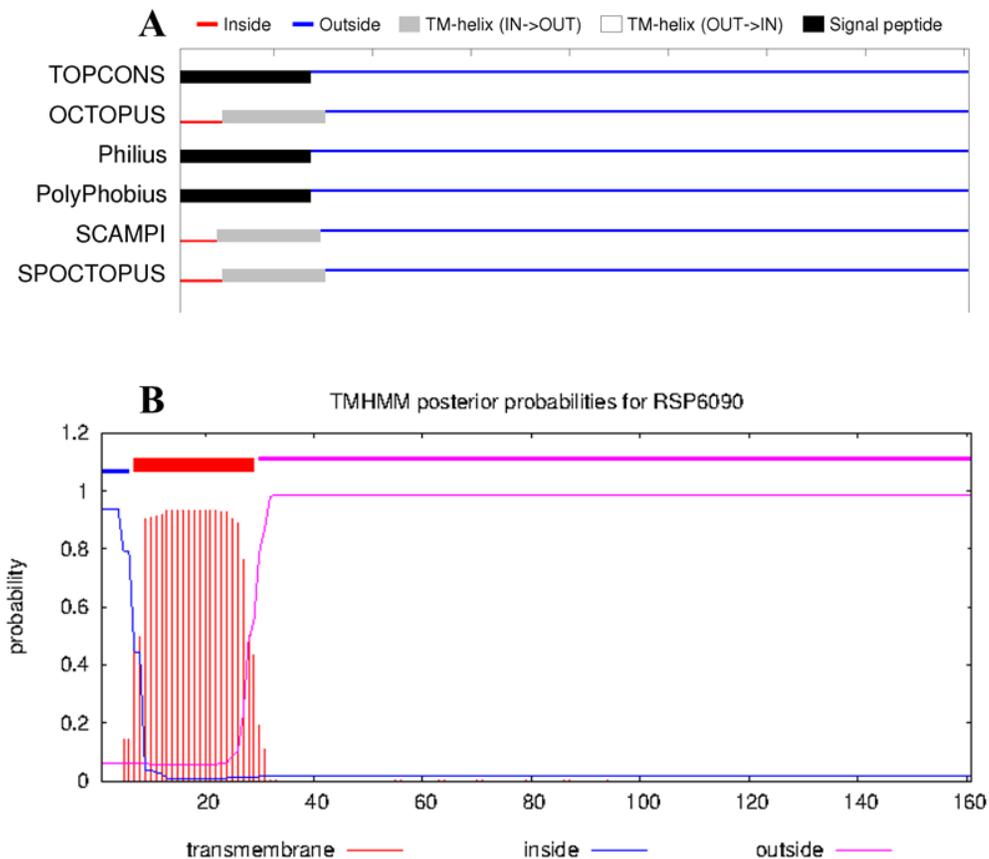


Figura 16. Análisis de topología de la proteína codificada por RSP6090. A. Análisis realizado con TOPCONS. B. Predicción de cruce transmembranal realizado en TMHMM. Se ilustra la hélice transmembranal en forma de recuadro color rojo.

Mutación en RSP6090 y RSP0038

Para comenzar con el estudio de los ORFs, se llevó a cabo una mutación por interrupción en RSP6090 y RSP0038 introduciendo un cassette de resistencia a espectinomicina en las secuencias. Las cepas seleccionadas, denominadas 6090 y 0038, se inocularon en cajas de agar suave para evaluar su capacidad de nado. Los fenotipos de ambas mostraron un halo de nado reducido, más no paralizado (Figura 17A). Se complementó a las mutantes con el vector pRK415 con la copia silvestre respectiva de cada gen. La cepas recuperaron casi en su totalidad el fenotipo de nado silvestre (Figura 17B).

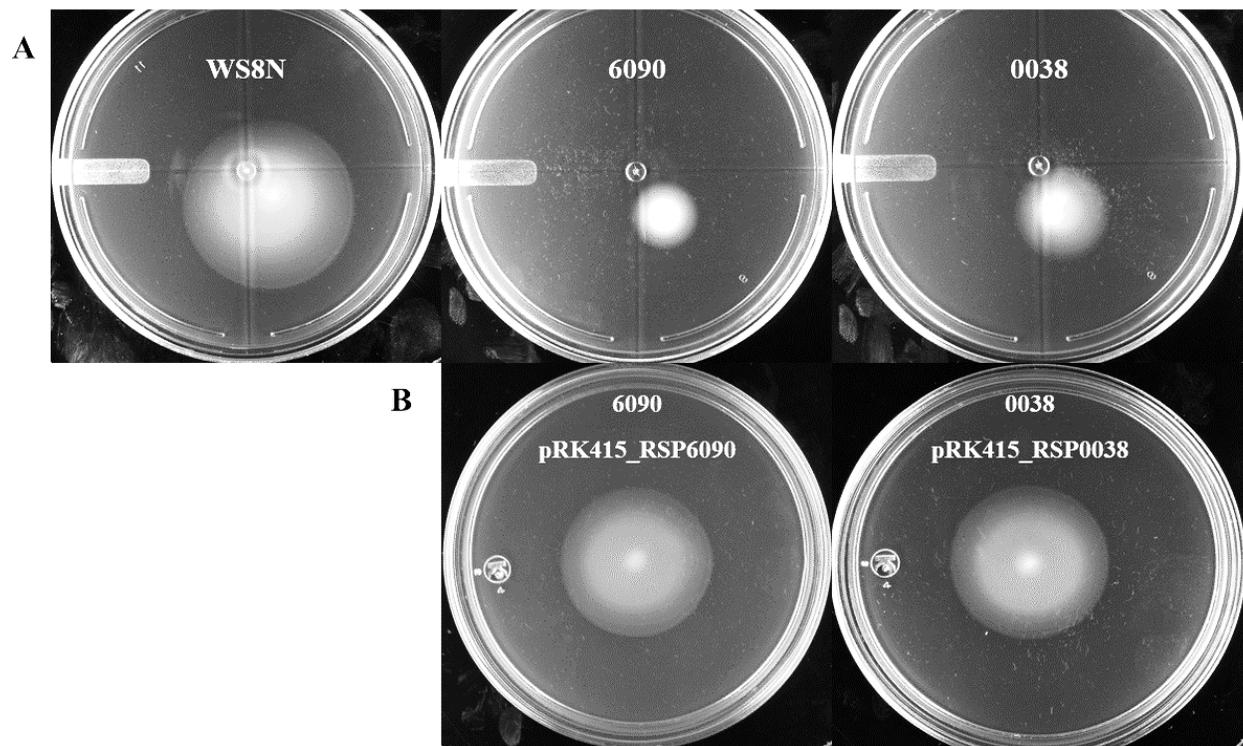


Figura 17. Fenotipos de las mutantes. Se muestran los fenotipos de las mutantes para RSP6090 y RSP0038. A) Halos de nado de WS8N (WT) y las mutantes 6090 y 0038. B) Halos de nado de las mutantes complementadas con el vector pRK415. Fotografías tomadas después de 48 horas de incubación.

Medición del halo de nado en placas de agar suave

Al observar la reducción del halo de nado de las cepas mutantes, decidimos llevar a cabo la medición del diámetro de éste, usando como control a WS8N. Realizamos el ensayo con 20 repeticiones bajo las mismas características. Se observó que el halo de nado de 6090 se reduce un

40%, mientras que 0038 muestra un halo de nado reducido en un 20%, ambos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Figura 18).

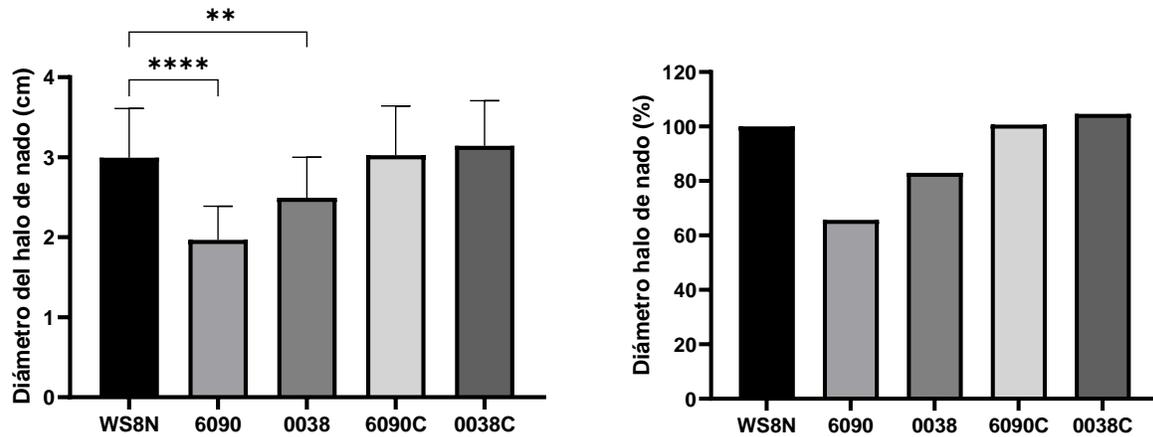


Figura 18. Diámetro del halo de nado. **A:** Se muestran las mediciones de los halos de nado para WS8N, mutantes 6090 y 0038, y complementaciones 6090C y 0038C. Las mediciones se realizaron después de 48 horas de incubación. *****: $p < 0.0001$. **: $p < 0.05$. **B:** Diámetro de los halos de nado normalizados para obtener porcentajes de la disminución de las mutantes.

Velocidad de las cepas y número de paros por segundo

En vista del resultado anterior y para dilucidar si la reducción del halo de nado de las mutantes se debía a un descenso en su velocidad de nado o una disminución en su número de reorientaciones, optamos por llevarnos a cabo la medición de la velocidad de desplazamiento y número de paros mediante el programa *CellTrack by Motion Analysis*[®]. El análisis se realizó para 30 células de cada cepa, incluyendo a WS8N como control. Notamos que 6090 presenta una reducción en su velocidad del 20.37% si se le compara con la cepa silvestre, siendo un resultado con significancia ($p < 0.05$). Por otra parte, 0038 parece desplazarse un 11.78% más rápido que WS8N, aunque el resultado no mostró significancia estadística ($p > 0.05$) (Figura 19).

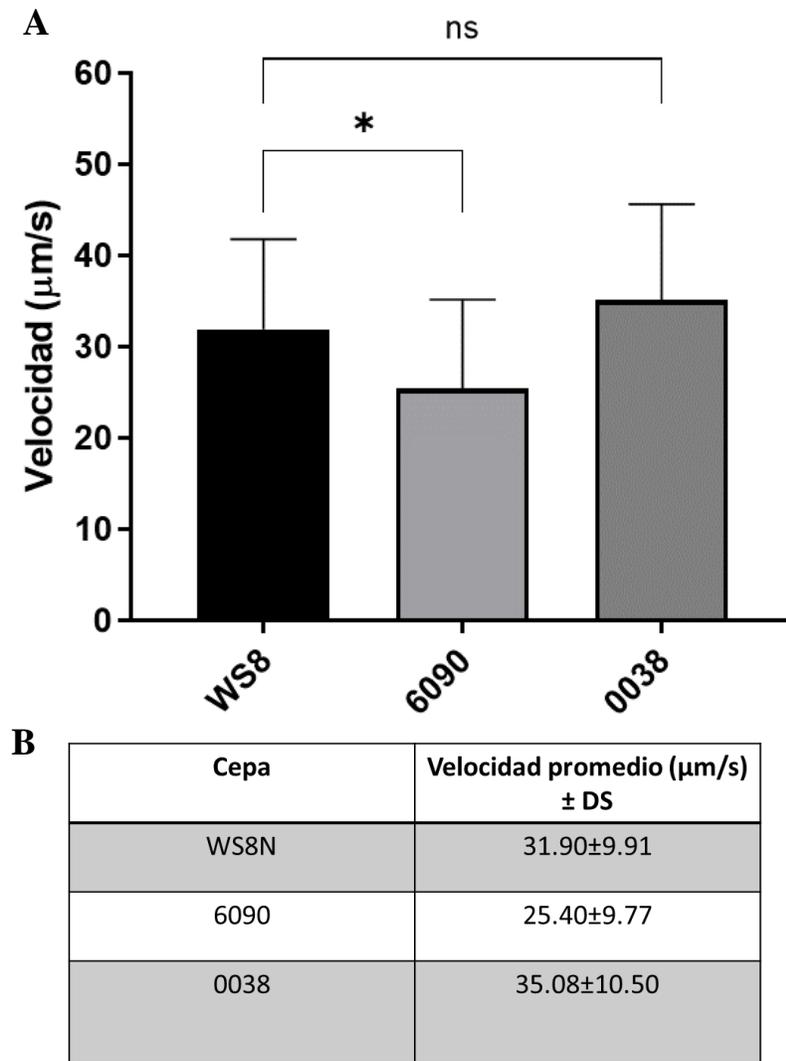
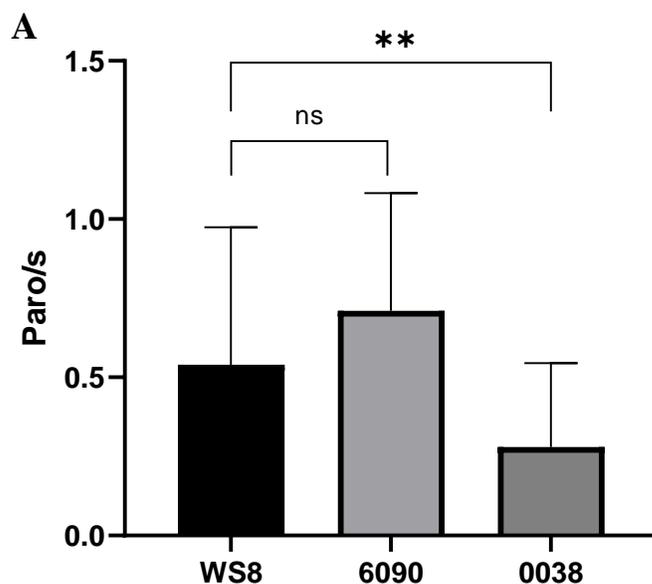


Figura 19. Velocidades de desplazamiento de las cepas. **A.** Se muestra la gráfica de mediciones de velocidad para WS8N, 6090 y 0038. *: $p < 0.05$. ns: no significativo. **B.** La tabla indica la velocidad promedio de nado de cada cepa con desviación estándar.

Además, observamos que 6090 realiza 29.62% más reorientaciones que la cepa silvestre, aunque este resultado carece de significancia estadística ($p > 0.05$). Para 0038, observamos que el número de reorientaciones disminuye un 51.85% respecto a WS8N, siendo un resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Figura 20).



B

Cepa	Paros por segundo
WS8N	0.54±0.43
6090	0.70±0.49
0038	0.28±0.26

Figura 20. Número de reorientaciones por segundo. **A.** Se muestra la medición de los paros por segundo realizados por las cepas WS8N, 6090 y 0038. **: $p < 0.05$. ns: no significativo. **B.** En la tabla se observa el promedio de paros por segundo de las cepas.

Modificación de las variables de las placas de nado

Puesto que la velocidad y el número de reorientaciones de las cepas mutantes se ven alteradas, y con el conocimiento de que RSP6090 puede ser un homólogo lejano de FliL, decidimos probar si la modificación de dos variables que juegan un papel importante en la generación de torque del motor, como son la viscosidad del medio y la disponibilidad de protones (H^+), afectaban aún más al fenotipo mutante. Lo anterior lo llevamos a cabo en dos ensayos independientes, cada uno con 20 repeticiones para cada cepa.

Cambio en la concentración de agar

Comenzamos por cambiar la concentración de agar de las placas de nado, pasando de 0.25% a 0.30%, 0.35% y 0.40%. Este cambio aumenta la viscosidad del medio por lo que la bacteria requiere una generación mayor de torque para poder desplazarse. Inoculamos las placas con las

cepas mutantes y la cepa silvestre. Al realizar las mediciones, notamos que el diámetro del halo de nado disminuye en todas las cepas. Sin embargo, el cambio se mantiene proporcional a lo observado en la concentración de 0.25% de agar (Figura 21).

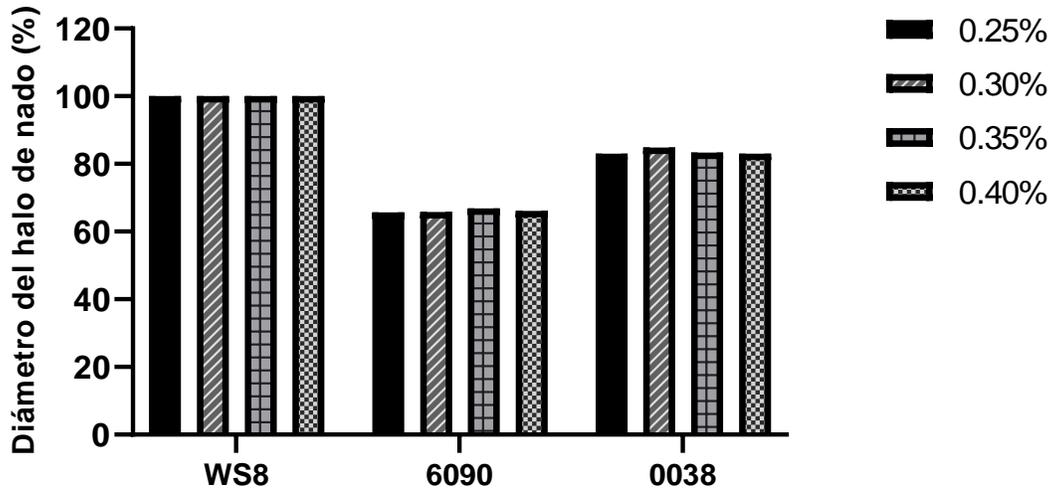


Figura 21. Diámetro del halo de nado con cambio en la concentración de agar. La gráfica normalizada muestra el diámetro de los halos de nado con las concentraciones de agar probadas. Se observa que proporción se mantiene entre las cepas respecto al control (0.25% de agar). Las mediciones se realizaron después de 48 horas de incubación.

Cambio en el pH del medio

La otra variable modificada fue el pH del medio -Sux. Tomando como control el medio a pH 7, probamos pH 6 y pH 8; donde la concentración de protones aumenta o disminuye, respectivamente. Esta modificación cambia la disponibilidad de protones para el gradiente utilizado por el motor de *R. sphaeroides*. Inoculamos las placas de nado con las cepas mutantes y silvestre. Realizamos mediciones del diámetro del halo y observamos que éste aumenta a pH 6 y disminuye a pH 8 (Figura 22). Este cambio es proporcional a lo descrito en pH 7.

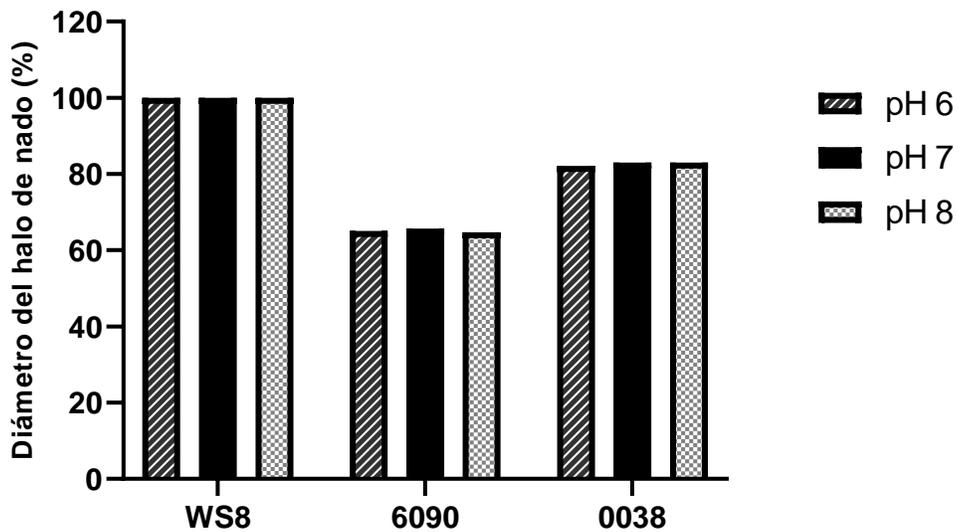


Figura 22. Medición del halo de nado con cambios en el pH del medio. Gráfica normalizada que muestra el diámetro del halo de nado de las cepas WS8N, 6090 y 0038 en placas de nado con pH 6, 7 y 8. La proporción se mantiene constante respecto al control (pH 7). Las mediciones se realizaron después de 48 horas de incubación.

Velocidad de las cepas: modificación de viscosidad y pH del medio

En vista de que a nivel poblacional (placas de nado) no se encontró un cambio en el fenotipo al variar los parámetros de viscosidad y pH, cambiamos el enfoque de los ensayos hacia un nivel individual. Decidimos medir la velocidad de desplazamiento de las cepas mutantes y silvestre, pero modificando la viscosidad y el pH del medio. Esto lo realizamos en dos ensayos independientes, muestreando 30 células de cada cepa.

Modificación de la viscosidad con Ficoll 400

Adicionamos distintas concentraciones de Ficoll 400 al medio de nado (-Sux+cas). Observamos que a una concentración de 10% p/v de Ficoll la cepa silvestre detiene su desplazamiento. Debido a esto, decidimos probar las concentraciones de 4, 5, 6 y 7 % p/v para comenzar a estandarizar el protocolo. El cambio en la velocidad y número de reorientaciones entre la concentración de 4 y 5 % p/v de Ficoll 400 no mostraron una diferencia significativa, por lo que omitimos estas dos concentraciones. De esta forma, sólo probamos las concentraciones 6 y 7 % p/v. Notamos que las cepas mutantes reducen aún más su velocidad de desplazamiento cuando se enfrentan a un medio con mayor viscosidad (Figura 23).

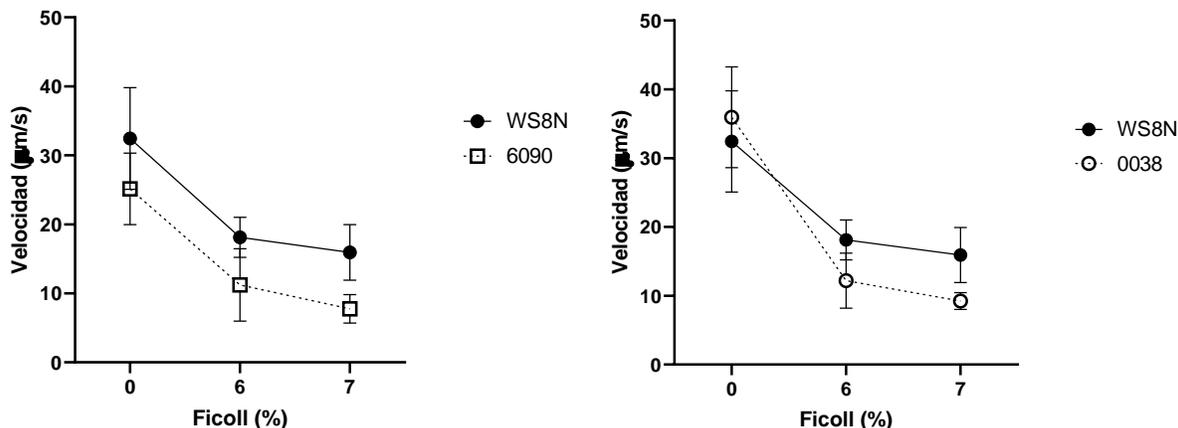


Figura 23. Efecto de la viscosidad en las mutantes 6090 y 0038. A. Velocidad de nado de WS8N y 6090 analizada con concentraciones crecientes de Ficoll 400. B. Velocidad de desplazamiento de WS8N y 0038 con incremento de Ficoll 400 en el medio de nado.

Dicha reducción no es proporcional a la observada en el medio sin Ficoll 400, siendo más evidente el cambio en la mutante 0038. Con un 6% de Ficoll, esta mutante reduce su velocidad de desplazamiento en un 32.74% respecto a la cepa silvestre, siendo que en un medio sin espesante 0038 nadaba un 11.78% más rápido. Por otra parte, 6090 también reduce su velocidad de nado sin mostrar un patrón proporcional, de 20.37% a 36.05% más lento que WS8N, en presencia de Ficoll al 6% (tabla 4). Cabe señalar que las reducciones en la velocidad son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cepa	Control (Ficoll 0% p/v)	Ficoll 6% p/v	Ficoll 7% p/v
6090	Reducción de 20.37% respecto a WS8N	Reducción de 36.05% respecto a WS8N Ficoll	Reducción de 51.67% respecto a WS8N Ficoll
0038	Aumento de 11.78% respecto a WS8N	Reducción de 32.74% respecto a WS8N Ficoll	Reducción de 42.53% respecto a WS8N Ficoll

Tabla 4. Porcentaje de reducción del nado para las cepas mutantes. La tabla nos muestra el cambio que hubo en la velocidad de desplazamiento de las cepas mutantes al agregar Ficoll 400 al

medio de nado. Se observa que el cambio no se mantiene proporcional con el control. Los valores se estandarizaron para obtener los porcentajes.

Cambio en el pH del medio de nado

El medio de nado -sux+cas fue modificado a pH 6 y 8; tomando como control pH 7. Al analizar el desplazamiento observamos una inversión en la velocidad de nado de las mutantes a pH 6. La mutante 6090 parece compensar la reducción en la velocidad de nado, pasando de una reducción de 20.38% a 7.72%, es decir, se desplaza un 12.66% más rápido a pH 6. En contraparte, la velocidad de desplazamiento de 0038 muestra lo inverso a 6090, siendo que pasa de nadar un 11.78% más rápido que WS8N a desplazarse un 27.46% más lento. En otras palabras, la cepa 0038 reduce su velocidad un 39.24% a pH 6. Cabe señalar que los cambios en la velocidad de nado de las cepas mutantes son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Por otra parte, a pH 8 las cepas no muestran un cambio en su velocidad de desplazamiento, es decir, se mantiene la proporcionalidad entre pH 7 y pH 8 (Figura 24).

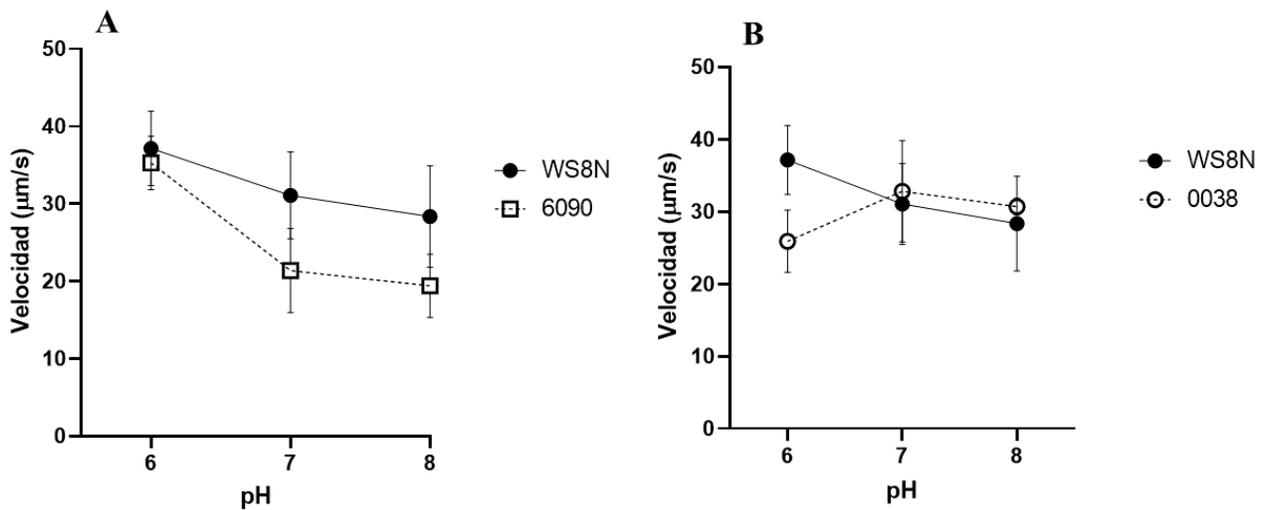


Figura 24. Efecto del pH sobre la velocidad de desplazamiento de las mutantes. A. Velocidad de desplazamiento de 6090 comparada contra la cepa silvestre. A pH 6 se observa un compensación del fenotipo mutante. B. Velocidad de nado de 0038 comparada contra la cepa silvestre. Se puede observar que la mutante reduce drásticamente su velocidad al estar en un medio a pH 6.

Fenotipo de la doble mutante

Al observar los datos obtenidos y considerando que RSP6090 y RSP0038 se encuentran en lo que parece ser el mismo operón, decidimos obtener una doble mutante (DM) para estos ORFs con el fin de estudiar su fenotipo. Comenzamos con el análisis de las placas de agar suave. Observamos que el fenotipo de la DM es muy parecido al de 6090, siendo un fenotipo no paralizado, pero reducido. Al medir el halo de nado, notamos que éste se reduce en un 42.56% respecto a la cepa silvestre y, por tanto, un 2.56% más pequeño que el halo de 6090 (Figura 25).

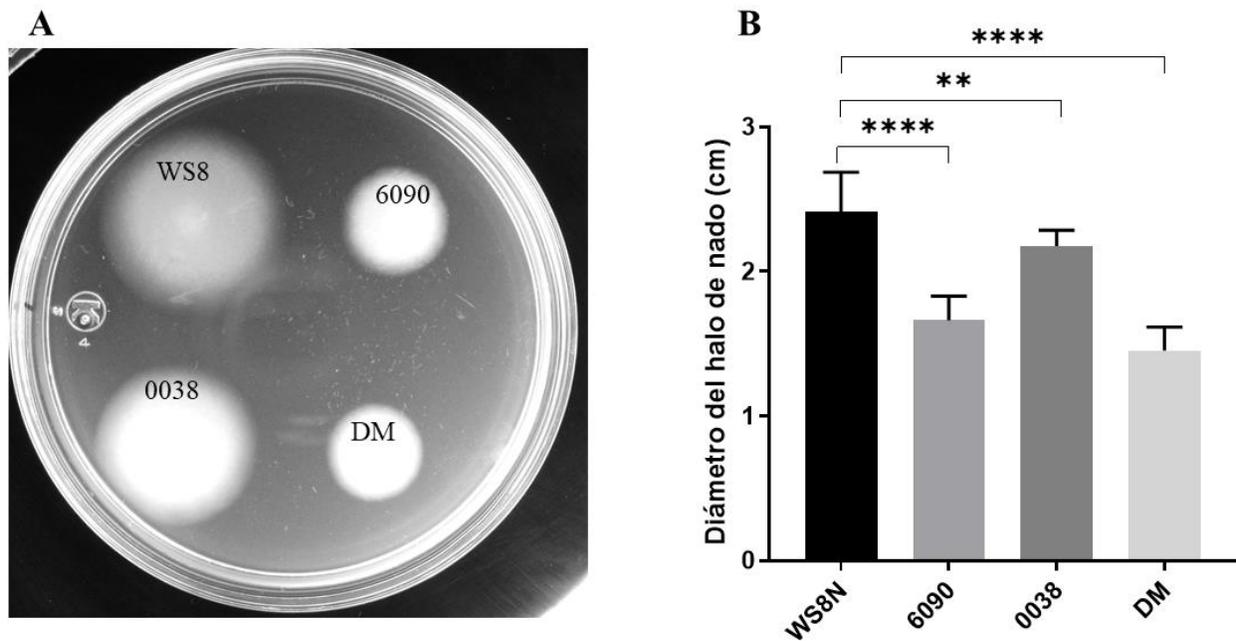


Figura 25. Fenotipo y diámetro del halo de nado de la DM. A. Se observa el fenotipo de las cepas mutantes y silvestre. B. Con el fin de comparar, la gráfica indica los diámetros de la cepa silvestre, 6090, 0038 y DM. **: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$. Las mediciones se realizaron después de 48 horas de incubación.

Incremento en el número de proteínas MotA y MotB

Tomando en cuenta que la velocidad de desplazamiento depende del torque generado por el motor y dado que las cepas mutantes presentaron distintos valores de velocidad y desplazamiento en placas de agar suave, decidimos suplementarlas con una construcción que contiene la secuencia codificante de MotA y MotB para observar si de alguna forma se podría compensar el cambio en la velocidad de desplazamiento de las mutantes. De esta forma, obtuvimos las cepas denominadas 6090/MotAB, 0038/MotAB, DM/MotAB y un control de WS8N/MotAB.

Comenzamos por un análisis de placas de nado con 0.25% de agar. Al medir el halo de nado de las cepas no observamos algún cambio relevante en su diámetro, a excepción de 0038/MotAB, donde el diámetro del halo se redujo un 11.21% respecto a WS8N. La medición de WS8N/MotAB tampoco varía respecto a la cepa silvestre (Figura 26). Estos fenotipos se mantienen a través de los experimentos realizados anteriormente en placas de agar suave.

Al llevar el análisis a un enfoque individual y medir la velocidad de desplazamiento y el número de reorientaciones de las cepas 6090, 0038 y DM, notamos un cambio radical. La velocidad de nado de las cepas mutantes complementadas con pRK415/*motA motB*/ aumentó de manera muy importante respecto a WS8N.

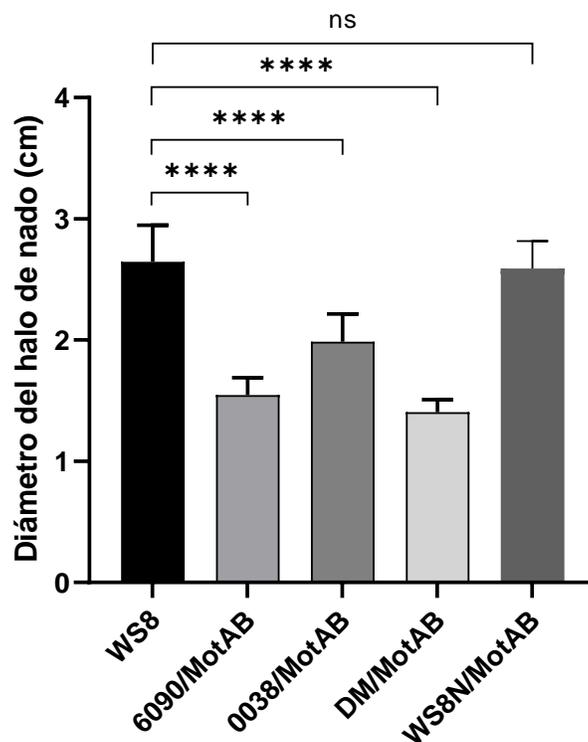


Figura 26. Medición del halo de nado. Se muestran los valores del diámetro del halo de nado de las cepas mutantes complementadas con pRK415/*motA motB*/ y el control negativo de WS8N/MotAB. ****: $p < 0.0001$. El análisis del diámetro del halo de nado se llevó a cabo después de 48 horas de incubación.

La cepa 6090/MotAB aumentó su velocidad de desplazamiento en un 66.46%, la velocidad de 0038/MotAB aumentó un 84.45% y la DM/MotAB logró nadar un 54.88% más rápido, todas siendo comparadas contra WS8N (Figura 27A). Por otra parte, el número de reorientaciones de las

cepas también mostró un cambio radical a la baja, es decir, las cepas mutantes complementadas con *motA* y *motB* disminuyeron significativamente su número de paros por segundo. 6090/MotAB redujo el número de reorientaciones un 88.64%, 0038/MotAB un 83.20% y DM/MotAB un 80.76%, en comparación con la cepa silvestre. (Figura 27B). Cabe señalar que usamos a WS8N/MotAB como un control, con el fin de determinar si el fenotipo obtenido en las cepas mutantes se debía a un fenómeno propio del vector o a una compensación del fenotipo mutante al tener mayor disponibilidad de proteínas MotA y MotB. Se observó que no existe cambio significativo entre WS8N y WS8N/MotAB, por lo que podemos afirmar que existe una compensación del fenotipo mutante al haber mayor disponibilidad de proteínas MotA y MotB.

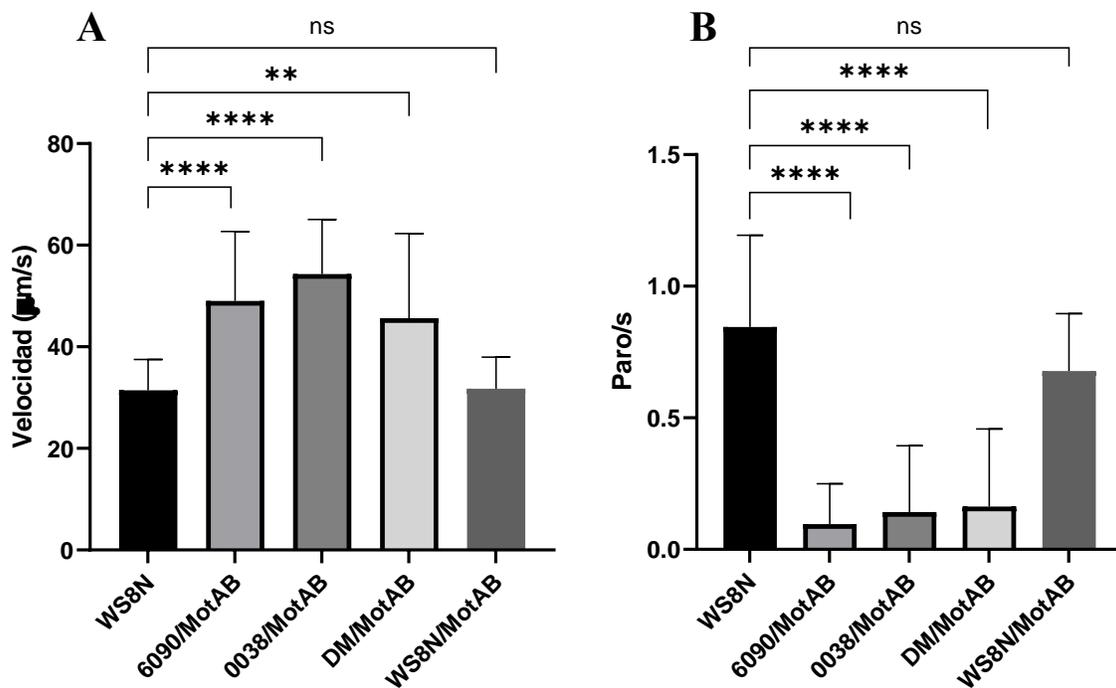


Figura 27. Compensación del fenotipo mutante mediante el vector pRK415/*motA motB*.

A. Las cepas mutantes aumentan la velocidad de nado y disminuyen la frecuencia de paro al ser complementadas con el vector pRK415. Se observa un aumento drástico en la velocidad de nado, el cual es estadísticamente significativo. B. El número de reorientaciones por segundo en las cepas complementadas con el vector muestran un descenso muy marcado de más del 50%. *****: $p < 0.0001$, **: $p < 0.05$, ns: no significativo.

Suplementación de las mutantes con pRK415/*FliL*

Como último ensayo y tomando en cuenta que RSP6090 puede estar relacionado con *FliL*, decidimos suplementar a las cepas mutantes con el vector pRK415/*FliL* con el fin de observar

si se complementa el fenotipo de nado y reorientaciones. Así obtuvimos las cepas 6090/FliL, 0038/FliL y DM/FliL, de las cuales medimos su velocidad de desplazamiento y reorientaciones por segundo. En primera instancia, notamos que la velocidad de nado de 6090/FliL se mantiene igual a la observada en la mutante sin complementar (20.37% más lenta que WS8N); 0038/FliL y DM/FliL disminuyen su velocidad, pero este cambio no es estadísticamente significativo (Figura 28A). Por otra parte, el número de reorientaciones de 6090/FliL se ve disminuido respecto a la cepa silvestre, pero este resultado no mostró significancia estadística. 0038/FliL y DM/FliL disminuyeron significativamente su número de paros por segundo (Figura 28B).

Los resultados observados en este ensayo no difieren de los obtenidos en el análisis de las cepas mutantes sin el vector pRK415/FliL. Las velocidades y número de paros por segundo promedio se mantienen, por lo que FliL_{RS} no es capaz de compensar el fenotipo mutante.

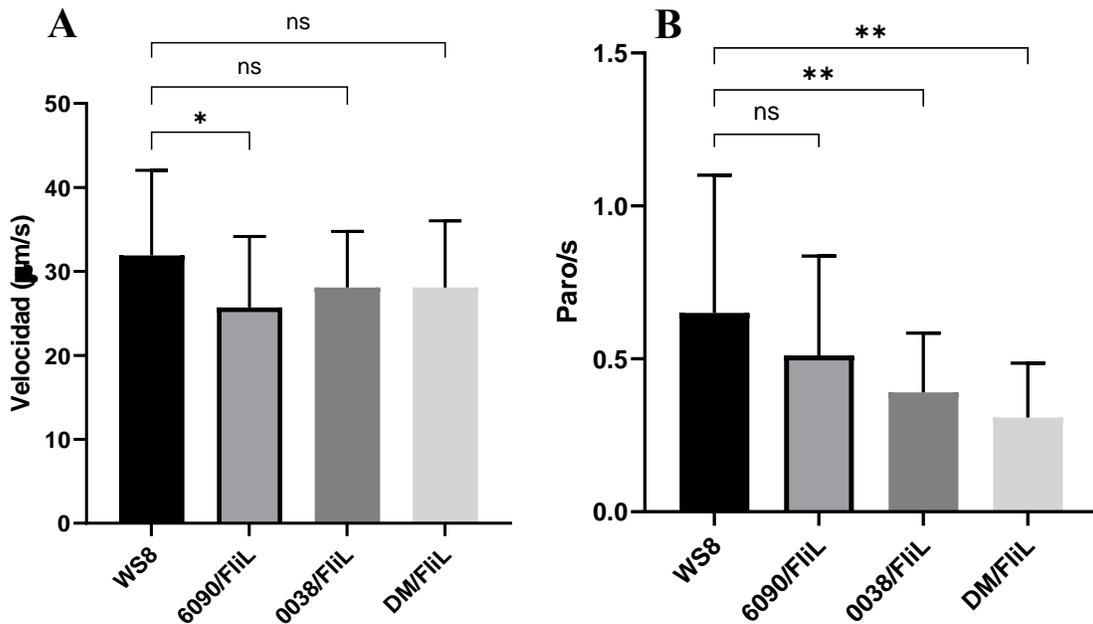


Figura 28. Fenotipo de las cepas mutantes suplementadas con pRK415/FliL. A. Velocidad de desplazamiento de las cepas mutantes con pRK415/FliL. No se observa un cambio en la velocidad de nado con respecto a las cepas sin plásmido. B. Número de reorientaciones por segundo de las cepas mutadas. No existe un cambio en el fenotipo de reorientaciones en las cepas complementadas con el vector. *, **: $p < 0.05$.

Discusión

En este trabajo llevamos a cabo el análisis de los ORFs RSP6090 y RSP0038 pertenecientes al sistema flagelar 1 de *R. sphaeroides*. Los análisis de identidad (BLAST) realizados con las secuencias de ambos ORFs sólo arrojaron proteínas hipotéticas conservadas en la familia Rhodobacteraceae, por lo que no tienen homólogos caracterizados. Cabe recordar que el sistema Fla1 fue adquirido mediante transferencia horizontal a partir de una gammaproteobacteria (Poggio et al., 2007), por lo que hallar dos genes conservados y restringidos a una sola familia de las α -proteobacterias puede ser indicio de una pérdida de éstos en las demás familias o podría ser que los productos de estos genes sean nuevos componentes flagelares en las rhodobacteraceas. No resulta extraño encontrar proteínas restringidas a un solo grupo filogenético. Un ejemplo de lo anterior es FlgX, una proteína citoplásmica caracterizada recientemente en *Campylobacter jejuni*. Análisis filogenéticos la limitan sólo al género *Campylobacter*. Esta proteína funciona como una chaperona de MotA, que estabiliza la estructura, y evita la proteólisis y ayudando en la generación de torque en altas viscosidades (Gao et al., 2014; Ribardo et al., 2019).

Por otra parte, al analizar el contexto genético de RSP6090 y RSP0038 encontramos que éste se mantiene conservado en unas pocas especies de la familia Rhodobacteraceae, junto a operones que contienen componentes del motor flagelar, lo que podría sugerir que su funcionamiento está relacionado con la motilidad (Figura 12).

RSP6090 parece guardar una similitud con la proteína flagelar FliL, aunque los análisis con BLAST realizados no arrojaron el alineamiento a menos que lleváramos a cabo una búsqueda que permitiera un *e-value* de 0.10-0.30, aprox. Al realizar esta búsqueda, RSP6090 se alinea con la proteína FliL de una gammaproteobacteria no caracterizada con un porcentaje de identidad del 28%. Por otra parte, cuando se llevó a cabo la predicción de la estructura terciaria de RSP6090 con SWISS-Model, se encontró similitud con el cristal de FliL de *V. alginolyticus* (FliL_{Va}) y *Helicobacter pylori*. Esto puede indicarnos que las diferencias en las secuencias podrían deberse a adaptaciones específicas que ha sufrido RSP6090 en *R. sphaeroides*. En contraparte, con RSP0038 no encontramos similitud con proteínas conocidas. Las proteínas homólogas predichas sólo corresponden a proteínas hipotéticas y, al igual que con RSP6090, RSP0038 parece estar restringida solo a la familia Rhodobacteraceae.

Al comenzar el análisis experimental de los ORFs, observamos que, si bien las placas de nado son un ensayo sencillo de realizar y pueden aportar información interesante sobre el fenotipo de nado de una mutante, para fines de este trabajo dicho análisis no fue el indicado. Esto debido a que, al modificar variables como viscosidad y pH del medio, no observamos ningún cambio en el fenotipo de las mutantes, lo que nos llevó a complementar la investigación con un análisis bajo el microscopio óptico. Este método nos permitió evaluar las trayectorias de desplazamiento de las bacterias, además de medir su velocidad y reorientaciones. De esta forma, la evaluación de la capacidad de nado de las mutantes para RSP6090 y RSP0038 se realizó mediante dos enfoques: placas de nado (enfoque poblacional) y análisis de trayectorias de nado (enfoque individual).

El fenotipo obtenido en placas de agar suave muestra que 6090 reduce su halo de nado drásticamente si se le compara con la cepa silvestre, pero se mantiene motil. Todo lo contrario a como se observa en la mutante de FliL de *R. sphaeroides*, la cual genera un halo de nado paralizado (Suaste-Olmos et al., 2010). Esta reducción en el halo podría deberse a la disminución de su velocidad de desplazamiento, la cual observamos al analizar las trayectorias de nado al microscopio óptico. Por otra parte, cuando se aumentó la viscosidad del medio de desplazamiento, la mutante 6090 redujo aún más su velocidad. Estos dos resultados nos indican que la mutante se ve comprometida en su capacidad de generación de torque, ya que existe una relación directamente proporcional entre el torque generado y la velocidad resultante (Berg et al., 1995; Ryu et al., 2000).

Un dato interesante es que, al llevar a cabo el ensayo de reducción de pH de 7 a 6 en el medio de nado, el fenotipo de 6090 parece compensarse. La velocidad de nado de la mutante regresa al estado silvestre (Figura 24). Pensamos que esto se debe a la mayor disponibilidad de protones en el medio, lo que aumenta la probabilidad de ser usados por el motor, como se ha descrito en bacterias marinas (Mitchell & Kogure, 2006b). Esto, aunado a la similitud de RSP6090 con FliL, puede indicar que RSP6090 participa en una dinámica de interacción con el complejo estator MotAB, ya sea en la estabilización de sus unidades o como un regulador de su función. Si bien se han descrito distintos fenotipos para las mutantes de FliL, en todos se observó que participa en la rotación flagelar y puede ser utilizada por varias bacterias para modular el torque y la motilidad (Guo et al., 2022).

Debido a lo anterior, decidimos introducir en la cepa mutante más copias de las proteínas MotA y MotB para probar si un exceso de complejos estatores podía compensar el defecto en su velocidad de nado. La sobreexpresión del complejo MotAB se ha llevado a cabo en distintos

trabajos de motilidad bacteriana. Un ejemplo de esto fue con *S. typhimurium*, en donde se probó que la simple sobreexpresión de MotAB no puede compensar el defecto de nado asociado con la pérdida de FliL (Partridge et al., 2015). En nuestro trabajo, al observar el resultado de la sobreexpresión, constatamos que la mutante aumenta su velocidad de desplazamiento en un 66% respecto a la cepa silvestre, compensando el fenotipo. Suponemos que RSP6090 ayuda en la estabilización o reclutamiento del complejo estator, pero en su ausencia, los estatores no pueden alcanzar su ocupación máxima alrededor del flagelo, reduciendo así la velocidad generada. Cuando aumentamos la cantidad de proteínas MotAB asistimos este proceso, permitiendo una mayor cantidad de estatores, lo que se ve reflejado en el aumento drástico en la velocidad de nado de la mutante 6090; un fenómeno probabilístico parecido a la disponibilidad de protones al reducir el pH. Sin embargo, el número de reorientaciones de esta mutante se reduce de manera radical respecto a WS8N, es decir, la bacteria sólo se desplaza a mayor velocidad sin detenerse tan frecuentemente. Esto parece indicar que la adaptabilidad de la célula puede verse sumamente reducida, ya que perdería en la competencia por los nutrientes frente a bacterias que suelen detenerse a sentir el medio en el que se desplazan (Khan & Scholey, 2018).

Como se mencionó previamente, en *R. sphaeroides* existen dos sistemas flagelares, Fla1 y Fla2. Cada sistema tiene una proteína FliL (FliL1 y FliL2) que al ser mutada genera un fenotipo con defecto en el nado (Mot⁻). Por otra parte, en el sistema Fla2 se ha detectado un ORF que parece ser una segunda copia de FliL (FliL2b), la cual también genera un fenotipo parecido; su caracterización se encuentra en proceso (J. de la Mora, comunicación personal). Tomando en cuenta esto, podemos pensar que RSP6090 es una segunda copia de FliL dentro del sistema Fla1, debido a la similitud estructural predicha y a su aparente relación con el estator. No obstante, el fenotipo de RSP6090 difiere totalmente de ser paralizado.

Con la idea de que RSP6090 y FliL1 llevan a cabo una función similar en el contexto flagelar, decidimos complementar a la mutante 6090 con copias extra de FliL1 para observar si de esta manera se compensaba la velocidad de nado reducida. Los resultados mostraron todo lo contrario, el fenotipo mutante se mantiene independientemente del exceso de copias de FliL1. Se ha propuesto que en *R. sphaeroides*, FliL junto con MotF son relevantes en la activación del canal de protones al interactuar con MotB (Fabela et al., 2013; Ramírez-Cabrera et al., 2012). Además, los distintos estudios con mutantes de FliL han concluido que es parte del cuerpo basal flagelar y podría tener un papel en la estabilización del estator (Belas, 2014). Esto nos lleva a pensar que

posiblemente existe una diferenciación de funciones entre FliL1 y RSP6090, lo que podría explicar el fenotipo de nado de esta última, pero con una velocidad de desplazamiento reducida. Nuestra hipótesis es que RSP6090 lleva a cabo una estabilización del complejo MotAB a nivel de membrana; permitiendo que éste se integre a la dinámica de recambio de estatores en el flagelo; mientras que FliL asiste en la apertura del canal de protones del motor. Se deben llevar a cabo más ensayos para apoyar o descartar esta conjetura.

Encontrar duplicaciones genéticas en el genoma bacteriano es muy frecuente. La mayoría de los genes duplicados se elimina a corto plazo, y los que quedan pueden mantener la función original y/o adquirir una nueva, ya sea por subfuncionalización o neofuncionalización (Álvarez-Lugo & Becerra, 2021). En *R. sphaeroides*, se han identificado 234 pares de genes duplicados. De éstos, 180 pares duplicaron antes de la especiación y 54 fueron posteriores a ésta. Estos genes pudieron tener una oportunidad de desarrollar nuevas funciones durante un período corto después del evento de duplicación (Peters et al., 2012; van de Peer et al., 2017). Si llevamos a cabo una búsqueda de homólogos para FliL1 restringida sólo a la familia Rhodobacteraceae, la proteína RSP6090 se alinea con un porcentaje de identidad del 29.47%, aunque es un porcentaje bajo, se acerca al 30% de identidad utilizado en trabajos anteriores con *R. sphaeroides* para considerar dos proteínas como homólogas (Bavishi et al., 2010). Además, el análisis filogenético realizado con las pocas secuencias existentes para RSP6090, generó un árbol que separa completamente a RSP6090 de FliL (Figura 15). Teniendo en cuenta lo anterior, no sería exagerado pensar que RSP6090 es una duplicación de FliL1, evolutivamente encaminada hacia una subfuncionalización o neofuncionalización. RSP6090 podría llevar a cabo una función que permitió aumentar la adecuación de su portadora y, por tanto, se ha mantenido a través de la evolución del organismo.

Es posible que el no encontrar más homólogos para RSP6090 en las bases de datos se deba a una falta de anotaciones en los genomas bacterianos o al bajo número de secuencias encontradas. Este punto es importante debido a que durante la búsqueda exhaustiva de secuencias para RSP6090, encontramos una bacteria no clasificada denominada Gammaproteobacteria bacterium EAC1938, la cual parece presentar dos copias de FliL en un mismo *cluster* flagelar, es decir, presenta una duplicación de FliL; lo que sería muy similar a los que proponemos para RSP6090 en el sistema Fla1 de *R. sphaeroides*.

Finalmente, cabe señalar que decidimos estudiar a RSP0038 junto con RSP6090 debido a su cercanía en el genoma, lo que podría indicarnos que se transcriben juntos. Partimos de esta idea

para llevar a cabo los distintos experimentos realizados. Sin embargo, una búsqueda extensa en la literatura nos llevó a encontrar que se predice un fragmento de 585 pb de DNA que contiene una región promotora dependiente de σ^{54} para RSP0038. Esto puede indicarnos que RSP0038 se transcribe independiente de RSP6090 (Peña-Sánchez et al., 2009a).

Como se mencionó, el fenotipo de RSP0038 en placas de nado de agar suave se muestra con una reducción del 20% en el halo de nado respecto a la cepa silvestre. Al igual que con RSP6090, pensamos que esta reducción podría deberse a una disminución en la velocidad de desplazamiento. Sin embargo, al analizar las trayectorias de nado de RSP0038, observamos que la velocidad no disminuye, pero el número de reorientaciones sí, aproximadamente en un 52% respecto a WS8N. Esta reducción podría explicar por qué vemos un halo de nado disminuido en las placas de agar suave.

Sin embargo, la velocidad de esta mutante se ve afectada cuando aumentamos la viscosidad del medio de desplazamiento, presentando una reducción de casi 33% respecto a la cepa silvestre. Esto podría deberse a un aumento en el número de reorientaciones, ya que con una concentración de Ficoll al 6%, RSP0038 realiza 15.19% más paros que la cepa silvestre. En otras palabras, al aumentar la viscosidad del medio, RSP0038 se detiene con mayor frecuencia.

Por otra parte, al analizar la velocidad de las trayectorias de RSP0038 en el experimento de reducción de pH, observamos que a pH 6 su velocidad se reduce en un 39.24% respecto a la silvestre. Este dato resulta interesante, ya que el fenotipo se ve afectado por la mayor disponibilidad de protones en el medio, lo que nos llevó a pensar que RSP0038 podría no estar relacionada directamente con el motor flagelar. Sin embargo, al aumentar el número de copias de MotAB, la mutante compensa la velocidad de nado reducida. Probablemente, esta proteína citoplásmica asista en una función quimiosensora, ya que su fenotipo se ve afectado en el número de reorientaciones, o posiblemente sea una chaperona de RSP6090, debido a que observamos una reducción significativa de la velocidad de nado al aumentar la viscosidad del medio, lo que podría señalar una función indirecta en la generación de torque. Es necesario llevar a cabo experimentos de localización celular e interacción de proteínas para poder defender plenamente el argumento anterior. Sin ello, resulta difícil entender la función de RSP0038 en el contexto flagelar.

Año con año se describen nuevos componentes relacionados con el flagelo. Muchos de éstos se caracterizan rápidamente debido a la conservación de estructuras que existe en este organelo. Sin embargo, estudios recientes han mostrado una diversidad significativa en las

estructuras flagelares (Du et al., 2018; Snyder et al., 2009), lo que puede complicar su caracterización genética. RSP6090 y RSP0038 podrían ser parte de nuevas estructuras flagelares en el sistema Fla1 de *R. sphaeroides*. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para poder introducirnos en el detalle de su funcionamiento y comprender cómo se han adaptado a través de la evolución, ayudando así a descifrar su papel dentro del flagelo bacteriano.

Conclusiones

- ❖ El arreglo genético en el que se encuentra RSP6090 y RSP0038 se encuentra conservado sólo en la familia Rhodobacteraceae.
- ❖ RSP6090 muestra homología con FliL.
- ❖ La proteína codificada por RSP6090 asiste directa o indirectamente en la generación de torque en *R. sphaeroides*.
- ❖ RSP6090 pudo originarse a partir de una duplicación genética de FliL.

Propuestas

- La pérdida de *rsp_6090* y/o *rsp_0038* en el genoma de *R. sphaeroides* podría reducir su adecuación.
- El estudio de RSP0038 requiere una mayor investigación, pero posiblemente su función esté relacionada con RSP6090.

Perspectivas

- Obtener la localización subcelular de RSP6090 y RSP0038.
- Determinar la localización del estator mediante una fusión con un reportero fluorescente en la cepa 6090, para conocer si éste localiza en ausencia de RSP6090.
- Determinar la localización de RSP6090 usando una fusión fluorescente en la cepa 0038, con el fin de observar si RSP6090 se localiza en ausencia de RSP0038.
- Estandarizar un protocolo de sobreexpresión para RSP6090 y RSP0038.
- Obtener anticuerpos contra las proteínas RSP6090 y RSP0038.
- Realizar un ensayo de interacción de RSP6090 con FliL, MotA, MotB, MotF y RSP0038, ya sea por doble híbrido o Co-inmunoprecipitación.

Referencias

- Abby, S. S., & Rocha, E. P. C. (2012). The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genetics*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002983>
- Aizawa, S.-I. (2014). Rhodobacter sphaeroides — A Resourceful Little Bug. *The Flagellar World*, 66–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00021-9>
- Akiba, T., Yoshimura, H., & Namba, K. (1991). Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5012), 1544–1546. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2047860>
- Álvarez-Lugo, A., & Becerra, A. (2021). The Role of Gene Duplication in the Divergence of Enzyme Function: A Comparative Approach. *Frontiers in Genetics*, 12, 1253. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.641817/BIBTEX>
- Armitage, J. P. (1999). Bacterial tactic responses. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 41, pp. 229–289). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60168-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60168-x)
- Armitage, J. P., & Macnab, R. M. (1987). Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides. *Journal of Bacteriology*, 169(2), 514. <https://doi.org/10.1128/JB.169.2.514-518.1987>
- Bavishi, A., Lin, L., Schroeder, K., Peters, A., Cho, H., & Choudhary, M. (2010). The prevalence of gene duplications and their ancient origin in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-331>
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517–527. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2014.05.002>
- Belas, R., & Suvanasthi, R. (2005). The ability of Proteus mirabilis to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *Journal of Bacteriology*, 187(19), 6789–6803. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6789-6803.2005>
- Berg, H. C., Schaub, M., Khan, S., Elliot, G., Schmid, M., Ming Ya Jiang, & Cooke, R. (1995). Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophysical Journal*, 68(4 Suppl), 163S. [/pmc/articles/PMC1281903/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1281903/)
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/JB.62.3.293-300.1951>
- 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. <https://doi.org/10.1021/BI035406D>
- Carroll, B. L., & Liu, J. (2020). Structural conservation and adaptation of the bacterial flagella motor. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10111492>
- Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(4), 694–708. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.694-708.2000>
- Deme, J. C., Johnson, S., Vickery, O., Aron, A., Monkhouse, H., Griffiths, T., James, R. H., Berks, B. C., Coulton, J. W., Stansfeld, P. J., & Lea, S. M. (2020). Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nature Microbiology*, 5(12), 1553–1564. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0788-8>

- Du, X., Kong, K., Tang, H., Tang, H., Jiao, X., & Huang, J. (2018). The Novel Protein Cj0371 Inhibits Chemotaxis of *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01904>
- Evans, L. D. B., Stafford, G. P., Ahmed, S., Fraser, G. M., & Hughes, C. (2006). An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(46), 17474–17479. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605197103>
- Fabela, S., Domenzain, C., de la Mora, J., Osorio, A., Ramirez-Cabrera, V., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2013). A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, *195*(23), 5285–5296. https://doi.org/10.1128/JB.00760-13/SUPPL_FILE/ZJB999092904SO1.PDF
- Fan, F., & Macnab, R. M. (1996). Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(50), 31981–31988. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.50.31981>
- Ferris, H. U., & Minamino, T. (2006). Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends in Microbiology*, *14*(12), 519–526. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2006.10.006>
- Fujii, T., Kato, T., & Namba, K. (2009). Specific Arrangement of α -Helical Coiled Coils in the Core Domain of the Bacterial Flagellar Hook for the Universal Joint Function. *Structure*, *17*(11), 1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.017>
- Gao, B., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Goodman, A. L., & Galán, J. E. (2014). Novel Components of the Flagellar System in Epsilonproteobacteria. *MBio*, *5*(3), 1349–1363. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01349-14>
- Guo, S., Xu, H., Chang, Y., Motaleb, M. A., & Liu, J. (2022). FliL ring enhances the function of periplasmic flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(11). https://doi.org/10.1073/PNAS.2117245119/SUPPL_FILE/PNAS.2117245119.SM01.MOV
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2007.09.014>
- Hernandez-Valle, J., Domenzain, C., de la Mora, J., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2017). The Master Regulators of the Fla1 and Fla2 Flagella of *Rhodobacter sphaeroides* Control the Expression of Their Cognate CheY Proteins. *Journal of Bacteriology*, *199*(5). <https://doi.org/10.1128/JB.00670-16>
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., & Aizawa, S. I. (2005). N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Molecular Microbiology*, *56*(2), 346–360. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04615.X>
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., & Aizawa, S. I. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *176*(17), 5439–5449. <https://doi.org/10.1128/JB.176.17.5439-5449.1994>
- Homma, M., & Iino, T. (1985). Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *162*(1), 183–189. <https://doi.org/10.1128/JB.162.1.183-189.1985>
- Hottes, A. K., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnell, Z. N., Liu, J. C., & Tavazoie, S. (2013). Bacterial Adaptation through Loss of Function. *PLoS Genetics*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003617>

- Jenal, U., White, J., & Shapiro, L. (1994). Caulobacter flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. *Journal of Molecular Biology*, 243(2), 227–244. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1994.1650>
- Kawamoto, A., & Namba, K. (2017). Structural Study of the Bacterial Flagellar Basal Body by Electron Cryomicroscopy and Image Analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1593, 119–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6927-2_9
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., & Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 70(1), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Khan, S., & Scholey, J. M. (2018). Assembly, Functions and Evolution of Archaeella, Flagella and Cilia. *Current Biology : CB*, 28(6), R278–R292. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.01.085>
- Kiley, P. J., & Kaplan, S. (1988). Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Reviews*, 52(1), 50–69. <https://doi.org/10.1128/MR.52.1.50-69.1988>
- Kojima, S., & Blair, D. F. (2001). Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry*, 40(43), 13041–13050. <https://doi.org/10.1021/BI011263O>
- Kubori, T., Yamaguchi, S., & Aizawa, S. I. (1997). Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 813–817. <https://doi.org/10.1128/JB.179.3.813-817.1997>
- Kutsukake, K., Ohya, Y., & Iino, T. (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 741–747. <https://doi.org/10.1128/JB.172.2.741-747.1990>
- 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. <https://doi.org/10.1038/NATURE05135>
- Lin, T. S., Zhu, S., Kojima, S., Homma, M., & Lo, C. J. (2018). FliL association with flagellar stator in the sodium-driven *Vibrio* motor characterized by the fluorescent microscopy. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-29447-X>
- Lukat, G. S., & Stock, J. B. (1993). Response regulation in bacterial chemotaxis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 51(1), 41–46. <https://doi.org/10.1002/JCB.240510109>
- Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, 57, 77–100. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.57.030502.090832>
- Macnab, R. M. (2004a). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2004.04.005>
- Macnab, R. M. (2004b). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2004.04.005>
- Martin, A. C., Gould, M., Byles, E., Roberts, M. A. J., & Armitage, J. P. (2006). Two chemosensory operons of *Rhodobacter sphaeroides* are regulated independently by sigma 28 and sigma 54. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7932–7940. <https://doi.org/10.1128/JB.00964-06>
- Martínez-Luque, M., Dobao, M. M., & Castillo, F. (1991). Characterization of the assimilatory and dissimilatory nitrate-reducing systems in *Rhodobacter*: a comparative study. *FEMS Microbiology Letters*, 83(3), 329–333. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1991.TB04485.X>

- Mead, D. A., Szczesna-Skorupa, E., & Kemper, B. (1986). Single-stranded DNA “blue” T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering*, 1(1), 67–74. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/1.1.67>
- Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., & Macnab, R. M. (2000). Role of FliJ in flagellar protein export in Salmonella. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4207–4215. <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4207-4215.2000>
- Minamino, T., & Macnab, R. M. (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Molecular Microbiology*, 37(6), 1494–1503. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2000.02106.X>
- Minamino, T., Morimoto, Y. v., Hara, N., & Namba, K. (2011). An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/NCOMMS1488>
- Minamino, T., & Namba, K. (2004). Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(1–2), 5–17. <https://doi.org/10.1159/000077865>
- Minamino, T., & Namba, K. (2008). Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, 451(7177), 485–488. <https://doi.org/10.1038/NATURE06449>
- Mitchell, J. G., & Kogure, K. (2006a). Bacterial motility: Links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00003.x>
- Mitchell, J. G., & Kogure, K. (2006b). Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2005.00003.X>
- Moriya, N., Minamino, T., Imada, K., & Namba, K. (2011). Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 5), 1354–1362. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.047100-0>
- Motaleb, M. A., Pitzer, J. E., Sultan, S. Z., & Liu, J. (2011). A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* fliL mutant. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3324–3331. <https://doi.org/10.1128/JB.00202-11>
- Nan, B., & Zusman, D. (2017). Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1111/mmi.13389>. Novel
- Nishihara, Y., & Kitao, A. (2015). Gate-controlled proton diffusion and protonation-induced ratchet motion in the stator of the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(25), 7737–7742. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1502991112>
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S. I., Macnab, R. M., & Iino, T. (1994). FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2272. <https://doi.org/10.1128/JB.176.8.2272-2281.1994>
- Osterman, I. A., Dikhtyar, Y. Y., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., & Sergiev, P. v. (2015). Regulation of Flagellar Gene Expression in Bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia*, 80(11), 1447–1456. <https://doi.org/10.1134/S000629791511005X>
- Ottemann, K. M., Thorgeirsson, T. E., Kolodziej, A. F., Shin, Y. K., & Koshland, D. E. (1998). Direct measurement of small ligand-induced conformational changes in the aspartate

- chemoreceptor using EPR. *Biochemistry*, 37(20), 7062–7069.
<https://doi.org/10.1021/BI980305E>
- Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y. K., & Koshland, D. E. (1999). A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5434), 1751–1754. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5434.1751>
- Partridge, J. D., Nieto, V., & Harshey, R. M. (2015). A new player at the flagellar motor: FlIL controls both motor output and bias. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02367-14>
- Peña-Sánchez, J., Poggio, S., Flores-Pérez, U., Osorio, A., Domenzain, C., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2009a). Identification of the binding site of the $\{\sigma\}$ ₅₄ hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 5), 1669–1679. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.024455-0>
- Peña-Sánchez, J., Poggio, S., Flores-Pérez, U., Osorio, A., Domenzain, C., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2009b). Identification of the binding site of the σ ₅₄ hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar Promoters of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 155(5), 1669–1679. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024455-0>
- Peters, A. E., Bavishi, A., Cho, H., & Choudhary, M. (2012). *Evolutionary constraints and expression analysis of gene duplications in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-192>
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G., Vinuesa, P., & Camarena, L. (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3208–3216. <https://doi.org/10.1128/JB.01681-06>
- 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. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04900.X>
- Quandt, J., & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)
- 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), 6174–6183. https://doi.org/10.1128/JB.00850-12/SUPPL_FILE/ZJB999092128SO1.PDF
- Ribardo, D. A., Kelley, B. R., Johnson, J. G., & Hendrixson, D. R. (2019). A chaperone for the stator units of a bacterial flagellum. *MBio*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01732-19/ASSET/6ED1A121-DEAE-4096-94B7-05C7F2607A54/ASSETS/GRAPHIC/MBIO.01732-19-F0008.JPEG>
- Ryu, W. S., Berry, R. M., & Berg, H. C. (2000). Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature*, 403(6768), 444–447. <https://doi.org/10.1038/35000233>
- Saijo-Hamano, Y., Uchida, N., Namba, K., & Oosawa, K. (2004). In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*. *Journal of Molecular Biology*, 339(2), 423–435. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.03.070>
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt², F., Kumasaka³, T., Yamamoto³, M., & Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. In *NATURE* (Vol. 410). www.nature.com

- Schultz, J. E., & Weaver, P. F. (1982). Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology*, *149*(1), 181–190. <https://doi.org/10.1128/JB.149.1.181-190.1982>
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* *1983 1:9*, *1*(9), 784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- SISTROM, W. R. (1960). A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Journal of General Microbiology*, *22*, 778–785. <https://doi.org/10.1099/00221287-22-3-778>
- Snyder, L. A. S., Loman, N. J., Fütterer, K., & Pallen, M. J. (2009). Bacterial flagellar diversity and evolution: seek simplicity and distrust it? *Trends in Microbiology*, *17*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.10.002>
- Stock, J., & da Re, S. (2000). Signal transduction: response regulators on and off. *Current Biology : CB*, *10*(11). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00509-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00509-1)
- 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), 6230–6239. <https://doi.org/10.1128/JB.00655-10>
- Suzuki, H., Yonekura, K., Murata, K., Hirai, T., Oosawa, K., & Namba, K. (1998). A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export. *Journal of Structural Biology*, *124*(2–3), 104–114. <https://doi.org/10.1006/JSBI.1998.4048>
- Takekawa, N., Isumi, M., Terashima, H., Zhu, S., Nishino, Y., Sakuma, M., Kojima, S., Homma, M., & Imada, K. (2019). Structure of vibrio flil, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function. *MBio*, *10*(2). https://doi.org/10.1128/MBIO.00292-19/SUPPL_FILE/MBIO.00292-19-ST002.PDF
- Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M. (2008). Chapter 2 Flagellar Motility in Bacteria. Structure and Function of Flagellar Motor. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 270, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01402-0](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01402-0)
- van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(7), 411–424. <https://doi.org/10.1038/NRG.2017.26>
- Vega-Baray, B., Domenzain, C., Rivera, A., Alfaro-López, R., Gómez-César, E., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2015). The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. *Journal of Bacteriology*, *197*(5), 833–847. <https://doi.org/10.1128/JB.02429-14>
- Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(12), 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/NRM1524>
- Xin, X., & Othmer, H. G. (2012). A “trimer of dimers”-based model for the chemotactic signal transduction network in bacterial chemotaxis. *Bulletin of Mathematical Biology*, *74*(10), 2339–2382. <https://doi.org/10.1007/S11538-012-9756-7>
- Yamashita, I., Hasegawa, K., Suzuki, H., Vonderviszt, F., Mimori-Kiyosue, Y., & Namba, K. (1998). Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. *Nature Structural Biology*, *5*(2), 125–132.

- Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T., & Homma, M. (2004). Multimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biochemistry*, *135*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1093/JB/MVH005>
- Yuan, J., Fahrner, K. A., & Berg, H. C. (2009). Switching of the bacterial flagellar motor near zero load. *Journal of Molecular Biology*, *390*(3), 394–400. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2009.05.039>
- Zaslaver, A., Mayo, A. E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., Tsalyuk, M., Surette, M. G., & Alon, U. (2004). Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nature Genetics*, *36*(5), 486–491. <https://doi.org/10.1038/NG1348>
- Zhou, J., Lloyd, S. A., & Blair, D. F. (1998a). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6436–6441. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.11.6436>
- Zhou, J., Lloyd, S. A., & Blair, D. F. (1998b). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6436–6441. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.11.6436>
- Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H. L., Lloyd, S. A., Billings, S., Braun, T. F., & Blair, D. F. (1998). Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *Journal of Bacteriology*, *180*(10), 2729–2735. <https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2729-2735.1998>