



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

CARACTERIZACIÓN DE FigT EN *Rhodobacter sphaeroides*: FORMACIÓN
DEL ANILLO H EN UNA BACTERIA IMPULSADA POR PROTONES

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

PRESENTA:
SALVADOR FABELA SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. FEBRERO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Para Soco y Vale.

Para Isis.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Laura Camarena Mejía, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue apoyado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT 106081) y por DGAPA/UNAM (IN206811). Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (No. de becario: 205985).

A Laura Camarena, por la formación, la confianza depositada y la paciencia. Por las enseñanzas, la influencia indeleble y su integridad.

A los miembros de mi comité tutor: Georges Dreyfus Cortés y Bertha González Pedrajo. Por los consejos y asesoría brindada a lo largo de este proyecto.

A mis sinodales: Miguel Ángel Cevallos Gaos, Diego González Halphen, Juan Xicohténcatl Cortés y Luis Servín González. Por las ideas y correcciones.

A Clelia Domenzain, por la inmensa ayuda otorgada para la culminación de este proyecto, por el apoyo moral y académico. Por la sólida amistad forjada. Por ser un Chemibús entrañable.

A Sebastian Poggio, por las ideas, las discusiones y la acidez.

A Aurora Osorio, por la ayuda brindada y el conocimiento compartido.

A Fercho y Florence, porque las tardes en el laboratorio se convertían en carnavales.

INDICE

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	9-26
El motor flagelar de Vibrio	16
FlgT en Vibrio	18
Generalidades de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	22
Hipótesis	27
Objetivos	27
Objetivos particulares	27
Resultados	28-45
Análisis de la secuencia codificada por RSP_6086	28
La ausencia de FlgT genera un fenotipo paralizado	29
FlgT es una proteína periplásmica	31
FlgT se expresa en la jerarquía flagelar	33
FlgT interactúa con las regiones periplásmicas de FliL y MotB	34
FlgT interactúa con un fragmento de MotF	36
FlgT estabiliza la localización de MotF	37

Pseudorevertantes de <i>flgT</i> mapean en <i>motB</i>	41
FlgT se requiere para formar un anillo que cubre los anillos LP	44
Discusión	46
Conclusiones	52
Material y métodos	53
Bibliografía	66
Anexo	77

Resumen

En este trabajo describimos una proteína periplásmica que es esencial para la rotación flagelar en *Rhodobacter sphaeroides*. Esta proteína está codificada río arriba de *flgA*, y su expresión depende tanto del regulador flagelar maestro FleQ, como del activador flagelar de clase III FleT. El análisis de secuencia de esta proteína sugiere que es un homólogo distante de la proteína FlgT, recientemente reportada en *Vibrio*. En *R. sphaeroides*, FlgT interactúa con las regiones periplásmicas de MotB, FliL y con la proteína flagelar MotF, la cual se caracterizó recientemente como un componente membranal del flagelo en esta bacteria. De acuerdo a estas observaciones, hemos determinado que la localización de GFP-MotF depende por completo de FlgT. Algunas mutaciones puntuales en MotB, las cuales presumiblemente mantienen el canal de protones abierto, suprimieron débilmente el fenotipo Mot⁻ de las células $\Delta flgT$. Por otro lado, el fenotipo Mot⁻ también se rescató por mutaciones en *motB* que se aislaron a partir de células que recobraron la capacidad de nado en ausencia de FliL y MotF. Sin embargo, la baja eficiencia de dicho fenómeno sugiere que FlgT podría desempeñar un papel adicional a la sola apertura del canal de protones (formado por las proteínas MotA/B). La presencia de FlgT en los complejos gancho-cuerpo basal purificados a partir de la cepa silvestre, se confirmó mediante Western blot. La visualización de estas estructuras bajo el microscopio electrónico mostró que los cuerpos basales de las células $\Delta flgT$ habían perdido un anillo que cubre a los anillos LP en la estructura silvestre. Además, MotF se detectó mediante Western blot en los cuerpos basales obtenidos de la cepa silvestre, pero no en aquellos de la cepa $\Delta flgT$. Con estos resultados, proponemos que FlgT es

necesaria para la formación de un anillo alrededor del anillo LP, el cual ancla a MotF y podría participar en la estabilización del estator en el motor flagelar.

Abstract

In this work, we describe a periplasmic protein that is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. This protein is encoded upstream of *flgA*, and its expression is dependent on the flagellar master regulator FleQ and on the class III flagellar activator FleT. Sequence comparisons suggest that this protein is a distant homologue of FlgT. We show evidence that in *R. sphaeroides*, FlgT interacts with the periplasmic regions of MotB and FlilL and with the flagellar protein MotF, which was recently characterized as a membrane component of the flagellum in this bacterium. In addition, the localization of green fluorescent protein (GFP)-MotF is completely dependent on FlgT. The Mot⁻ phenotype of *flgT* cells was weakly suppressed by point mutants of MotB that presumably keep the proton channel open and efficiently suppress the Mot⁻ phenotype of *motF* and *flilL* cells, indicating that FlgT could play an additional role beyond the opening of the proton channel. The presence of FlgT in purified filament-hook-basal bodies of the wild-type strain was confirmed by Western blotting, and the observation of these structures under an electron microscope showed that the basal bodies from *flgT* cells had lost the ring that covers the LP ring in the wild-type structure. Moreover, MotF was detected by immunoblotting in the basal bodies obtained from the wild-type strain but not from *flgT* cells. From these results, we suggest that FlgT forms a ring around the LP ring, which anchors MotF and stabilizes the stator complex of the flagellar motor.

Introducción

Las células procariontes han desarrollado complejas y diversas formas para desplazarse. Fenómenos tales como deslizamiento bacteriano (*gliding*), movimiento mediante pili (twitching) o nado en enjambre (swarming), permiten a las bacterias moverse sobre superficies sólidas o semisólidas (para una revisión de estos mecanismos, ver Jarrell y McBride, 2008). Sin embargo, el flagelo bacteriano, cuya función estriba en impulsar a la célula en medios líquidos, es la estructura más documentada asociada a la motilidad. El flagelo puede dividirse en tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal (Figura 1).

El filamento es una estructura cilíndrica, larga y delgada que posee forma helicoidal, por lo que al rotar a cientos de revoluciones por minuto, funciona como una propela dando impulso a la célula. Las dimensiones del filamento en *E. coli* rondan los 10-15 μm de largo y los 20 nm de diámetro, lo cual hace que sea la estructura del flagelo que posee la mayor cantidad de masa. El filamento está conformado por subunidades de flagelina (FliC); sin embargo, en algunas especies el filamento se compone de diversas flagelinas con diferentes pesos moleculares conformando un solo filamento (Macnab 2003, Erhardt *et al*, 2010).

El gancho es una estructura cilíndrica que sirve como la unión universal entre el filamento y el cuerpo basal. En bacterias peritricas como *Salmonella*, el gancho cumple la importante función de permitir que los flagelos se entrecrucen para formar la trenza que impulsa a la célula (Macnab, 1977).

El cuerpo basal es la parte más compleja del flagelo. Contiene el aparato de secreción tipo III que exporta las subunidades axiales del flagelo y también contiene el motor flagelar, cuya función radica en generar el torque, transmitirlo al gancho y ulteriormente al filamento (Minamino *et al*, 2008).

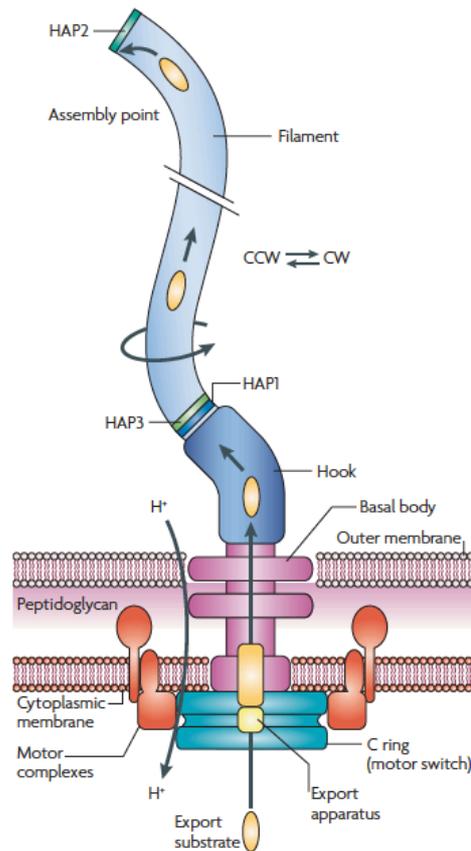


Figura 1. Modelo del flagelo bacteriano: estructura y ensamblaje. El flagelo bacteriano consiste de 3 partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. Se conocen la mayoría de los componentes flagelares y su localización. El gradiente de protones cruza la membrana citoplásmica y genera la fuerza que impulsa el movimiento del motor (Tomado de Jarrell y McBride, 2008).

El motor flagelar es una nanomáquina que convierte el flujo de iones de sodio (Na^+) o de protones (H^+) en rotación mecánica. Se compone de un rotor, un eje y al menos 11 estatores (Reid, *et al*, 2005, Leake *et al*, 2006). En *E. coli* y en *Salmonella*, las proteínas que forman el rotor son FliG, FliM y FliN. Las proteínas que forman el estator en especies impulsadas por protones (en su mayoría neutrófilas), son MotA y MotB (Figura 2); mientras que en especies impulsadas por sodio (alcalófilas y *Vibrio marinas*), son PomA y PomB (Blair, 2003; Li *et al*, 2011).

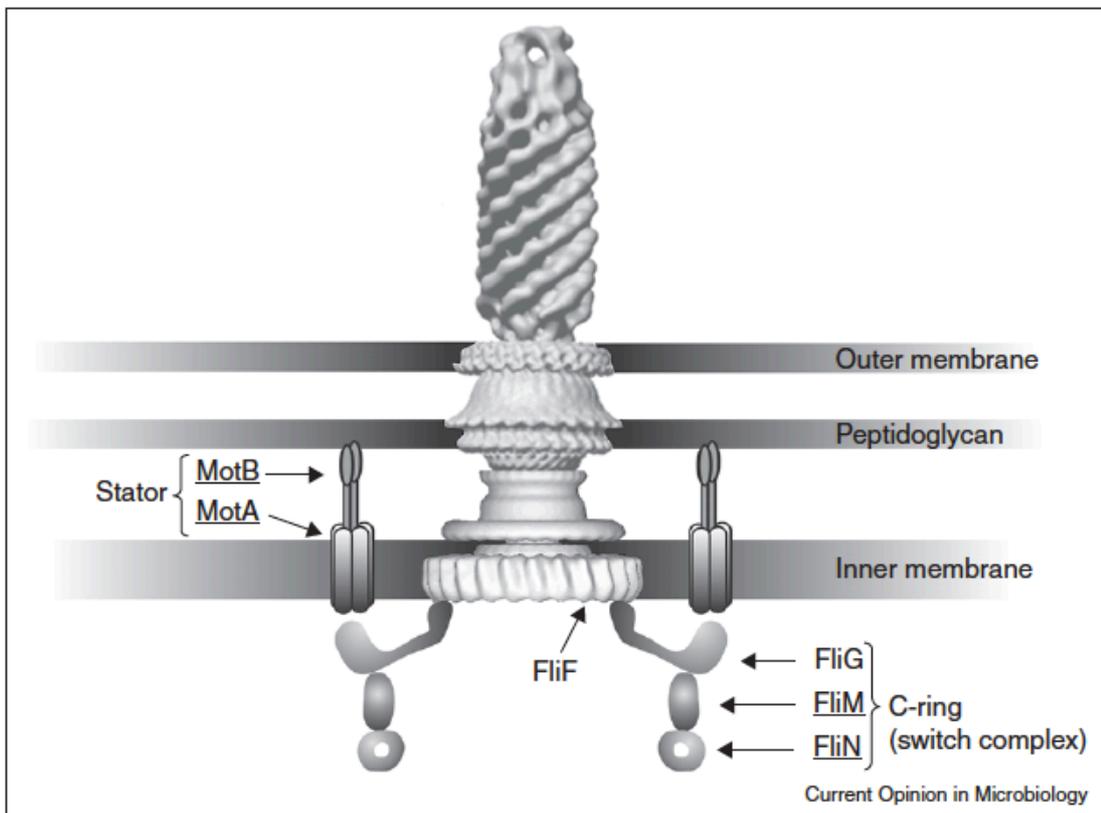


Figura 2. Estructura del motor flagelar bacteriano. Se muestran esquematizadas las 3 proteínas del rotor (FliG, FliM y FliN) y las dos del estator (MoA y MotB). (Tomado de Brown *et al*, 2011)

En bacterias impulsadas por protones, el torque se genera mediante interacciones electrostáticas entre MotA y FliG. (Zhou *et al* 1998). FliG se divide en al menos tres dominios: FliG_N, FliG_M y FliG_C (Kihara *et al*, 2000). La estructura cristalográfica de un fragmento de FliG compuesto por la porción C-terminal que abarca dos tercios de la proteína completa, muestra dos dominios compactos, FliG_M y FliG_C, conectados por un α -hélice y un *linker* corto (Brown *et al*, 2007).

Los residuos cargados que son responsables de las interacciones electrostáticas con otros residuos cargados de MotA para generar torque, están agrupados a lo largo de un borde de FliG_C (Lloyd *et al*, 1997). FliM y FliN forman un complejo estable que consiste de una copia de FliM y cuatro copias de FliN. La estructura cristalográfica de FliN muestra que esta proteína consiste en un tetrámero con forma de dona (Brown *et al*, 2005). MotA se compone de 295 residuos y tiene predichas 4 hélices transmembranales (TM1-TM4), dos bucles periplásmicos cortos que unen los dominios TM1-TM2 y TM3-TM4, y dos dominios citoplásmicos relativamente grandes: uno entre TM2 y TM3, y otro después de TM4. MotB posee 308 residuos y consiste de un dominio citoplásmico corto en el N-terminal, una hélice transmembranal y un gran dominio periplásmico. También contiene una secuencia consenso de unión a peptidoglicanos que ancla el estator a la pared celular (Dean *et al*, 1984; DeMot y Vanderleyden, 1994; Zhou *et al*, 1995).

Los complejos MotAB cruzan la membrana citosólica para formar los canales iónicos que regulan el flujo de protones, y se unen de forma no covalente a la pared de peptidoglicanos mediante el dominio periplásmico C-terminal de MotB. Se piensa que este dominio periplásmico de MotB sufre un cambio conformacional relativamente grande para unirse a la pared de peptidoglicanos, y así abrir la ruta para el paso de protones después de que los complejos MotAB se unieron al rotor (Kojima *et al*, 2008).

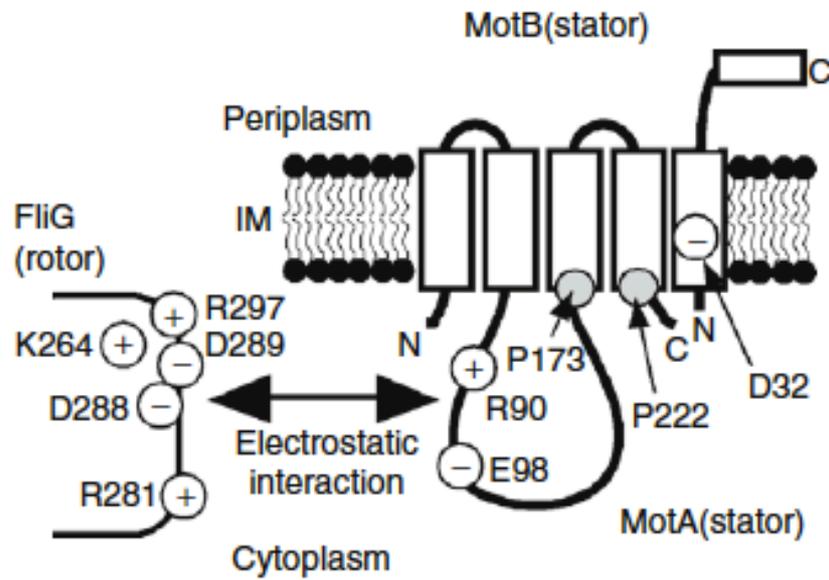
Se ha estimado que hay al menos 11 copias de los complejos MotA/MotB unidos alrededor del rotor (Reid *et al*, 2006). La estequiometría de los complejos del estator es MotA₄MotB₂, donde las hélices de MotA que atraviesan la membrana, rodean un sitio de unión a protones en el residuo Asp 32 de MotB (Kojima y Blair, 2004). Este residuo cargado conservado es el único en MotA o MotB que es esencial para la función, y dada la estequiometría se postula que cada estator contiene dos canales iónicos. (Braun y Blair, 2001).

Un mecanismo putativo para el funcionamiento del motor (Figura 3) es que el flujo de protones promueve cambios conformacionales en MotA mediante el residuo Asp-32 de MotB, y que esos cambios incluyen los residuos ácidos de MotA, lo que altera su interacción con FliG, que a su vez genera el torque (Sowa y Berry, 2008). Otra hipótesis más elaborada sugiere que la rotación se promueve por los cambios conformacionales cíclicos en el estator, lo cual ocurre cuando los protones se unen y se disocian del residuo Asp-32 de MotB. Estos cambios conformacionales regularían el acceso al sitio de Asp-32 para asegurar que los protones provenientes del periplasma entraran al citosol. Los cambios conformacionales en el estator aplicarían fuerzas al rotor, muy probablemente sobre FliG, y el efecto de las fuerzas lo determinarían los detalles de la topografía en la interfaz rotor-estator. Para sortear las altas cargas de fuerzas, el estator tendría que permanecer anclado con el rotor en todas sus conformaciones (Blair, 2003).

Se propone que MotA y MotB coexisten en la membrana de forma inactiva como parte del complejo. Posiblemente el dominio periplásmico de MotB, bloquea el flujo de protones a través del canal. Esta forma preensamblada del complejo puede difundir libremente en la membrana hasta que contacte un rotor. Una vez que el complejo ha tocado el motor, un cambio conformacional libera el bloqueo y activa el canal. En un evento conjunto o de manera

independiente, el dominio de unión a peptidoglicano de MotB se une a la pared celular (Van Way *et al*, 2000). La primera parte de este modelo ya tiene el apoyo de evidencia experimental. Se identificó un segmento corto en el dominio periplásmico de MotB que actúa como un tapón (*plug*) para bloquear el canal de protones. Los residuos 52-26 forman una hélice anfipática flanqueada por residuos de prolina.

A H⁺-driven flagellar motor



B Na⁺-driven flagellar motor

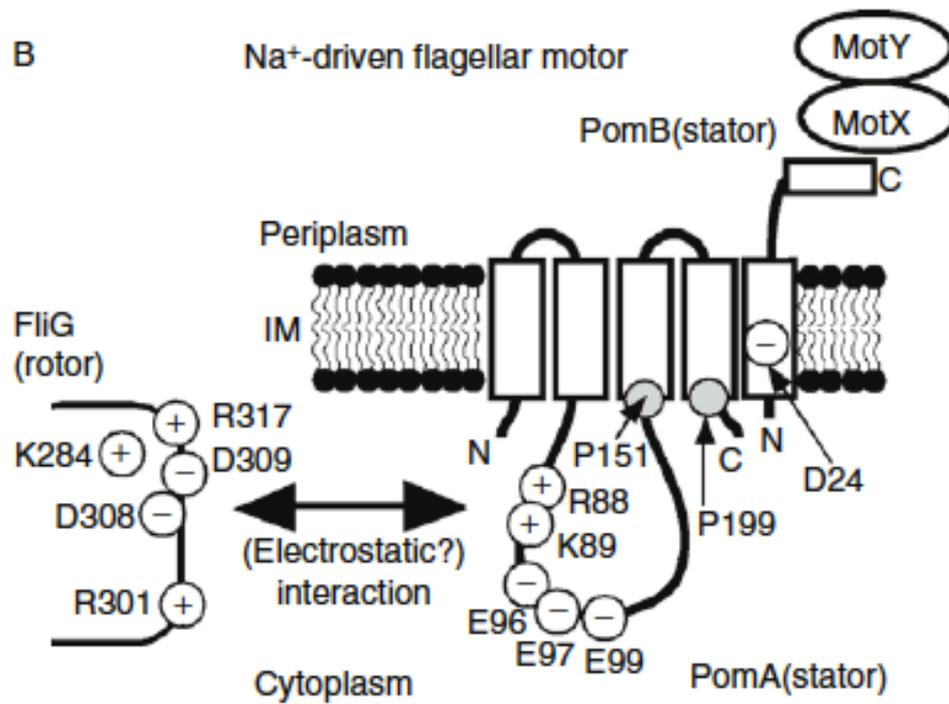


Figura 3. Residuos cargados de la interacción putativa entre estator y rotor. En el panel A se observan las interacciones en el motor impulsado por H⁺; en el panel B se aprecian las interacciones en el motor impulsado por Na⁺. Se cree que el residuo ácido aspártico en la subunidad B (D32), es un sitio de unión de iones. (Tomado de Terashima *et al*, 2008)

Los tapones se insertan en el canal de protones y la cara hidrofóbica del tapón interactúa con la membrana.

Las mutaciones que mantienen abiertos los canales de protones de forma continua, provocan que después de 1 hora a partir del momento de su expresión, el crecimiento celular se detenga. Esto se debe muy probablemente a la acidificación del citoplasma (Hosking *et al*, 2006).

Por otro lado, la primera estructura del rotor flagelar está formada por la proteína FliF; 26 subunidades de dicha proteína conforman el anillo MS, el cual se ensambla en la membrana interna y actúa como un andamio para el ensamble del resto del flagelo (Suzuki *et al*, 2004). Posteriormente se forma el complejo del *switch*, que contiene a las proteínas FliG, FliM y FliN. La estequiometría de estas proteínas en el anillo C han sido reportadas en 26, 34 y más de 100 copias, respectivamente (Francis *et al*, 1992; Suzuki *et al*, 2004; Thomas *et al*, 1994). Después, este complejo se ensambla en la base del anillo MS, donde forma el anillo C que asemeja una campana y que mide ~ 45 nm de diámetro. Esta estructura se encuentra unida no covalentemente al anillo MS mediante FliG (Macnab, 2003).

El motor flagelar en *Vibrio*

En bacterias impulsadas por sodio, los componentes del rotor son también FliG, FliM y FliN. Pero en *Vibrio alginolyticus* se hallaron ortólogos de MotA y MotB que se nombraron PomA y PomB (Asai *et al*, 1997) (Figura 4). PomA tiene la misma topología que MotA, y contiene los mismos residuos cargados conservados en el bucle citoplásmico, aunque la función de estos residuos no es clara, ya que mutaciones que eliminan las cargas tienen efectos menores en el nado. PomB tiene un residuo cargado conservado en el dominio transmembranal (Asp 24) cuya función es crítica para la movilidad y constituye el sitio de unión a los iones en el canal del estator, es decir, de manera casi idéntica que en MotB. Además de Asp-24, al menos otros dos carboxilatos constituyen los sitios de unión a Na⁺ en el estator. Asp-31 de PomA, que se localiza entre el primero y el segundo cruce transmembranal, y Ala-39 de PomB (Kojima *et al*, 2000).

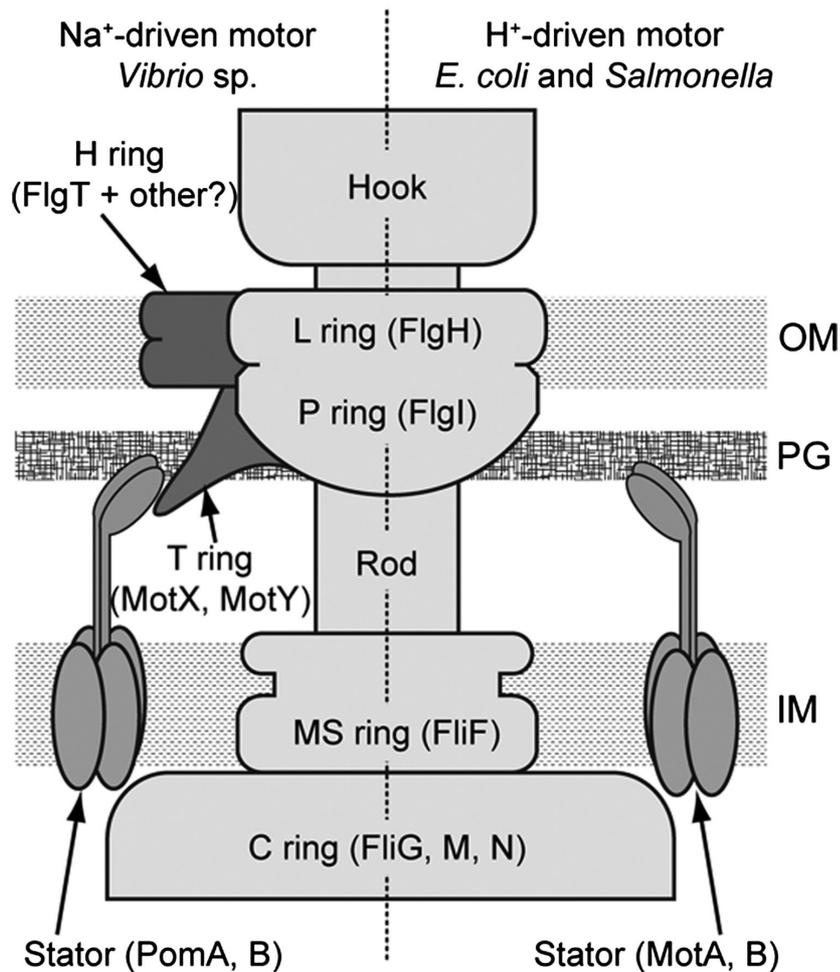


Figura 4. Diagrama esquemático comparativo entre los motores impulsados por Na^+ e impulsados por H^+ . La mitad izquierda de la imagen muestra el motor impulsado por Na^+ (*Vibrio*) y la mitad derecha muestra el motor impulsado por H^+ (*E. coli*, *Salmonella*). Los nombres de las proteínas que conforman las estructuras se muestran entre paréntesis (Tomado de Terashima *et al*, 2013).

V. parahaemolyticus utiliza el flagelo polar impulsado por Na^+ para nadar en medios líquidos, pero cuando se encuentra en medios viscosos produce flagelos laterales impulsados por H^+ . Se aislaron dos proteínas del motor de *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus* que se nombraron como MotX y MotY, ya que la ausencia de cualquiera de éstas impide la rotación del flagelo [McCarter, 1994 (a); McCarter, 1994 (b)]. Estas proteínas están conservadas en el género *Vibrio* y en otras bacterias filogenéticamente emparentadas a ella, como *Alteromonas*,

Pseudoalteromonas y *Photobacterium*. No tienen homología con MotA o MotB, a excepción de que MotY tiene un dominio de unión a peptidoglicanos. MotX y MotY forman una estructura adicional en el complejo gancho-cuerpo basal llamada anillo T, que se encuentra por debajo del anillo P y cuya función estriba en la incorporación o estabilización de unidades del estator que rodean al rotor (Terashima *et al*, 2006).

La estructura cristalográfica de MotY muestra dos dominios diferentes: un dominio N-terminal único y un C-terminal que muestra mucha similitud con otras proteínas de unión a peptidoglicanos (Kojima *et al*, 2008).

Si bien los anillos LP en *Vibrio* son del mismo tamaño que los de *E. coli* o *Salmonella*, la presencia del anillo T y el anillo H sugiere que el motor de *Vibrio* es estructuralmente más robusto que sus contrapartes impulsadas por H⁺. Esto cobra sentido cuando se comparan las velocidades de nado: el motor de *E. coli* rota a 300 Hz, mientras que el de *Vibrio* rota a 1700 Hz (Chen y Berg, 2000; Magariyama *et al*, 1994). Las fuerzas de torsión a las que están sometidos los motores impulsados por Na⁺ son considerablemente mayores.

FlgT en *Vibrio*.

Un estudio enfocado en identificar genes asociados a la movilidad mediante una biblioteca de mutaciones por inserción generada por transposones en *V. cholerae*, localizó un marco de lectura abierto (VC2208) cuya ausencia provocaba parálisis celular. El marco de lectura abierto fue nombrado *flgT* y el análisis bajo el microscopio electrónico de la cepa $\Delta flgT$, reveló que la mayoría de las células perdían el flagelo. Este fenotipo orilló a proponer que FlgT estaba involucrado en el ensamblaje flagelar (Cameron *et al*, 2008).

Después se reportó que las cepas de *V. cholerae* con defectos en FlgT, desarrollaban cierta debilidad de la membrana externa y liberaban el flagelo al medio, lo que sugería su

papel en anclar la base flagelar a la superficie celular (Martinez *et al*, 2010). Finalmente, la función específica de FlgT se aclaró cuando se observó que esta proteína forma una estructura anular que rodea a los anillos LP en *Vibrio*.

La nueva estructura se nombró anillo H y ahora se le reconoce como la parte externa de los anillos LP (Terashima *et al*, 2010) (Figura 5A). El análisis transcripcional de las cepas $\Delta flgT$ determinó que la mutante está detenida en la transición de la jerarquía flagelar III/IV, que controla FlgM, el factor anti- σ (Cameron *et al*, 2008). Adicionalmente, se observó que el número total de cuerpos basales disminuía significativamente en la ausencia de *flgT*, y que la cantidad de MotX, cuyo gen pertenece a la jerarquía transcripcional clase IV, decrecía en lisados celulares totales (Syed *et al*, 2009).

Lo anterior sugiere fuertemente que FlgT no sólo afecta el anclaje a la base del flagelo en la membrana, sino que además participa en la construcción de la estructura eje/gancho. También se demostró que FlgT co-purifica cuando se aíslan cuerpos basales de *Vibrio*, y mediante ensayos de coelución se observó que MotY y FlgT interactúan. Esto sugiere que FlgT es el blanco para el ensamble de MotY en el cuerpo basal, y que el anillo H es una estructura de andamiaje para formar el anillo T (Terashima *et al*, 2010).

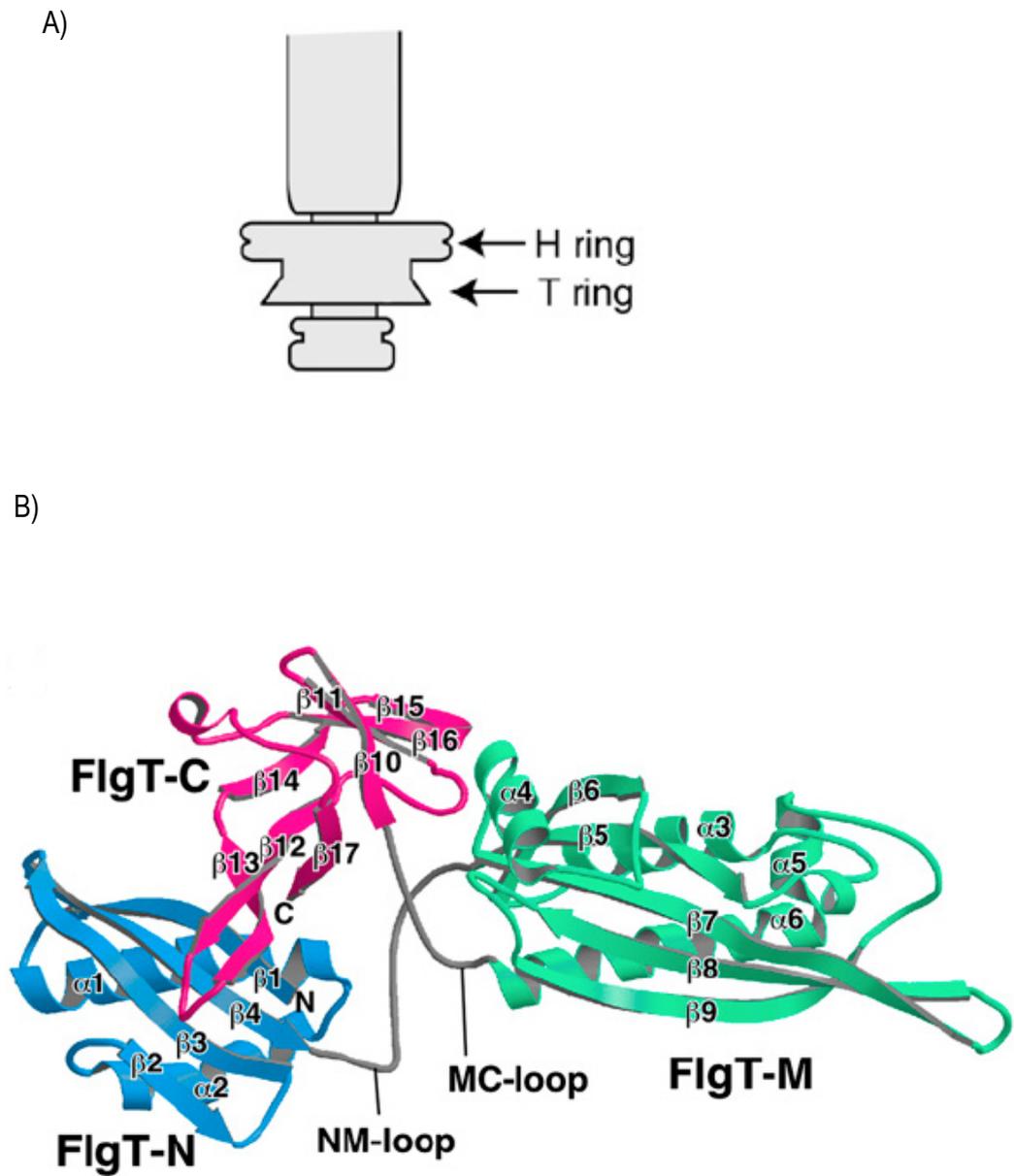


Figura 5. Estructuras de FlgT en *Vibrio*. En el panel A se muestra una representación esquemática del gancho- cuerpo basal de *Vibrio* donde se muestra el anillo H. En el panel B se muestra el dibujo de la estructura de FlgT. Los dominios FlgT-N, FlgT-M y FlgT-C están representados por los colores cian, verde y rojo, respectivamente (Tomado de Terashima *et al*, 2013).

Recientemente, Terashima y cols (2013) reportaron la estructura cristalográfica de FlgT a una resolución de 2.0-Å (Figura 5B). En esta estructura se aprecian 3 dominos: FlgT-N (Ser-24 a Tyr-109), FlgT-M (Lys-121 a Cys-287) y FlgT-C (Pro-292 a Leu-377). FlgT-N adopta la arquitectura de un sándwich con una bicapa α/β compuesto de cuatro láminas β anti-paralelas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) y dos α -hélices, $\alpha 1$ y $\alpha 2$. El dominio FlgT-M es el más grande y consiste de 5 láminas β plegadas ($\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$ y $\beta 9$), 4 α -hélices ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$) y una hélice corta 3_{10} .

El arreglo conformacional de las hojas β está mezclado: $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$ son paralelas, mientras que $\beta 7$, $\beta 8$ y $\beta 9$ son antiparalelas. La topología del doblamiento de FlgT-M es parecido al dominio N-terminal de TolB, la cual es una de las proteínas principales del sistema Tol-Pal. Este sistema se requiere para el mantenimiento de la estabilidad de la membrana externa, la división celular y la resistencia a antibióticos en bacterias Gram-negativas; asimismo, se requiere de fuerza motriz para el funcionamiento de este sistema (Cascales, *et al*, 2000). Las proteínas TolQ-TolR comparten homologías estructurales y funcionales con MotA-MotB (Cascales *et al*, 2001). No obstante, el tamaño de FlgT-M es mucho mayor que el dominio de TolB. FlgT-C se compone de 7 β plegadas ($\beta 10$, $\beta 11$, $\beta 12$, $\beta 13$, $\beta 14$, $\beta 15$ y $\beta 16$) y un segmento 3_{10} hélice. Seis de las 7 β ($\beta 10$ - $\beta 12$, $\beta 14$ - $\beta 16$) están arregladas en forma de barril β , mientras que $\beta 12$ sobresale del centro y forma un *hairpin* β con $\beta 13$. Los estudios de remoción de cada una de las regiones de FlgT, demostraron que FlgT-N y FlgT-M se requieren para una formación flagelar eficiente, mientras que FlgT-M se requiere para la movilidad celular. El papel de FlgT-C parece ser relativamente menor comparado con FlgT-N y FlgT-M (Terashima, *et al*, 2013).

Generalidades de *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides es una α -proteobacteria de vida libre que posee dos juegos de genes flagelares. El primero de estos juegos (referido de ahora en adelante como Fla-1), codifica para un flagelo subpolar que se expresa constitutivamente bajo condiciones de laboratorio. El segundo juego (referido de ahora en adelante como Fla-2), se identificó cuando se liberó el genoma completo de la bacteria en 2002. Para lograr la formación del flagelo codificado por Fla-2, fue necesario silenciar Fla-1 mutando FliC, e inocular esta cepa bajo condiciones de crecimiento fotoheterotróficas. Después de algunos días, se pudieron aislar colonias que se desplazaban. Para comprobar que lo hacían mediante los genes codificados por Fla-2, se realizaron micrografías electrónicas de transmisión y se comprobó la presencia de flagelos polares que formaban una trenza, muy diferente al flagelo subpolar formado por Fla-1.

Adicionalmente, ensayos de Western blot con anticuerpos específicos para proteínas de Fla-2, corroboraron que *R. sphaeroides* era capaz de formar un flagelo completamente funcional usando los genes de Fla-2. Interesantemente, estudios filogenéticos demostraron que el *cluster* flagelar Fla-1 se adquirió mediante un evento de transferencia horizontal, siendo una γ -proteobacteria la donadora; mientras que Fla-2 es el *cluster* flagelar endógeno (Poggio *et al*, 2007).

Un estudio posterior demostró que de las 6 proteínas quimiotácticas CheY presentes en *R. sphaeroides*, CheY1, CheY2 y CheY5 regulan la respuesta quimiotáctica de Fla-2. (Martínez del Campo *et al*, 2007). Ambos flagelos en *R. sphaeroides* son impulsados por H⁺ (Packer *et al*, 1994; Martínez del Campo *et al*, 2011).

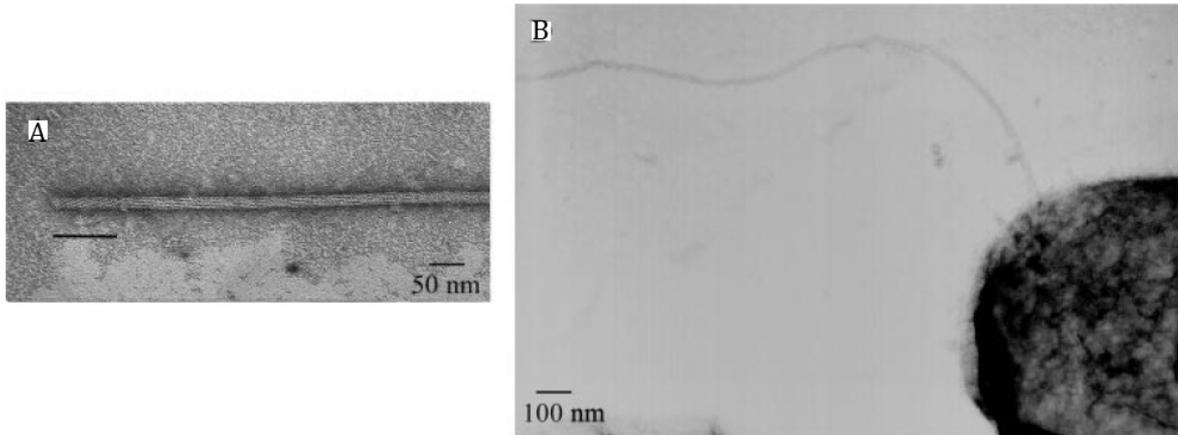


Figura 6. Micrografías electrónicas del flagelo Fla1 de *R. sphaeroides*. En el panel A hay un acercamiento al gancho y filamento. En el panel B, *R. sphaeroides* con el flagelo subpolar codificado por Fla1.

Los estudios hechos en Fla-1 de *R. sphaeroides* han detallado algunas particularidades estructurales y han documentado su forma de nado. A diferencia de *E. coli* y *Salmonella*, *R. sphaeroides* rota el flagelo en una sola dirección: en sentido de las manecillas del reloj. Para ajustar su trayectoria, la rotación flagelar se detiene momentáneamente y esto permite que el movimiento browniano reoriente la célula. Esta detención momentánea resulta en la relajación del filamento de su forma normal helicoidal polimórfica para la propulsión (amplitud pequeña, longitud de onda grande), a una forma helicoidal polimórfica enrollada (gran amplitud, longitud de onda corta) (Amitage y Macnab, 1987).

Estudios microscópicos demostraron que el gancho en esta especie es recto, a diferencia de sus contrapartes entéricas (West y Dreyfus, 1997). Si bien *R. sphaeroides* rota el flagelo gracias a H^+ , la velocidad a la que se desplaza supera incluso a las especies impulsadas por Na^+ . Esto podría ser indicativo de un motor robusto, con más componentes que las bacterias entéricas, algo similar a lo que ocurre en *Vibrio*.

FliL es una proteína integral de membrana que se encuentra bien conservada en las bacterias flageladas. Se copurificó con el cuerpo basal flagelar de *Salmonella*, y gracias a esto se propuso que FliL podría estar localizada alrededor del cuerpo basal, cerca de los complejos MotA-MotB (Schoenhals et al, 1999). Si bien se han reportado diferentes fenotipos para las cepas mutantes de *fliL* en diferentes especies bacterianas (Belas, et al, 2005; Belas et al 2009; Raha et al 1994; Kojima y Blair, 2004), nuestro grupo de trabajo demostró que ésta proteína es esencial para la rotación flagelar en *R. sphaeroides*. La remoción de FliL en *R. sphaeroides* impide el nado al imposibilitar la rotación del flagelo (fenotipo Mot-).

En concordancia con el resultado anterior, se había reportado que la ausencia de FliL provocaba un fenotipo Mot⁻ también en *Caulobacter crescentus* (Jenal et al, 1994) y en *Silicibacter* spp TM1040 (Belas et al, 2009). Sin embargo, hasta ese momento no existía ninguna razón que explicara el porqué las cepas FliL⁻ son incapaces de rotar el flagelo. En el laboratorio se obtuvieron ocho cepas pseudorevertantes del alelo $\Delta fliL$, y se determinó que en todas ellas existía un solo cambio en el gen *motB*. Este cambio ocurrió entre los aminoácidos 55 y 67, justo en la región que estudios previos determinan como el tapón (*plug*) para la entrada de H⁺ hacia el citoplasma (Hosking et al, 2006). Esto orilló a proponer que la proteína FliL participa en la apertura del canal de protones. Los experimentos realizados para revelar la posible interacción de las regiones periplásmicas de las proteínas FliL y MotB arrojaron resultados negativos, indicando que FliL y MotB podrían interactuar a través de las regiones transmembranales o que el efecto de FliL sobre MotB es indirecto. (Suaste et al, 2010).

Recientemente se identificó un nuevo componente del motor flagelar en *R. sphaeroides* que no tiene homología con ninguna proteína secuenciada hasta ahora. Esta proteína, nombrada MotF, tiene una región citoplásmica corta, un cruce transmembranal y una

larga región periplásmica de 163 aminoácidos. Su ausencia genera un fenotipo Mot-. Ensayos en diferentes fondos genéticos determinaron que la localización de MotF depende de la presencia de FliL y MotB.

Adicionalmente, la caracterización de una cepa pseudorevertante de $\Delta motF$ reveló que basta una mutación en *motB* para suprimir el fenotipo de una mutante en *motF*. Sin embargo, cuando los alelos supresores de *motB* obtenidos de la cepa $\Delta FliL$ fueron introducidos a la cepa $\Delta MotF$, se observó la recuperación de la capacidad de nado, lo que implica que MotF es también necesario para permitir la apertura del canal de protones.

A pesar de la relación directa que parecieran tener FliL y MotF, ensayos de doble híbrido en levadura demostraron que las regiones periplásmicas de estas proteínas parecen no interactuar (Ramírez-Cabrera *et al*, 2012).

Con el genoma completo de *R. sphaeroides* fue posible analizar con detalle la región flagelar Fla-1, y fue evidente la existencia de varios marcos abiertos de lectura (ORFs) cuyos productos no mostraban similitud significativa con otras proteínas conocidas. En ese momento se decidió caracterizar el papel del marco de lectura abierto RSP_6086, el cual se ubica en un operón río arriba de los genes flagelares *flgA* y *flgM*. En el mismo operón se encuentran también los ORFs RSP_0035 y RSP_6087 (Figura 7).

Un análisis de BLAST para proteínas reveló que RSP_0035 se encuentra bien conservada en diversas especies y contiene un dominio de función desconocida (DUF400). Particularmente, un estudio demostró que el homólogo de esta proteína en *Campylobacter jejuni*, nombrada FlgP, es esencial para la rotación del flagelo. En este caso, *flgP* está en un operón putativo junto con *flgQ*. La delección de cualquiera de estos genes arroja un fenotipo Mot-. Puntualmente, FlgQ parece estabilizar y localizar a FlgP en la membrana externa, ya que la ausencia de FlgQ disminuye considerablemente la concentración de FlgP y además la

proteína se acumula en el citoplasma. No es completamente claro el papel de FlgP en la estabilidad del motor flagelar de *C. jejuni*, sin embargo se propone que puede ser una proteína de membrana interna requerida para el proceso de rotación flagelar, es decir, un elemento del motor (Sommerlad y Hendrixson, 2006).

A partir de la transcripción de este operón se expresa la proteína FlgA, que está bien conservada en la mayoría de las especies flageladas. Se ha propuesto que es una chaperona de la proteína periplásmica FlgI, cuyo ensamble forma el anillo P. Dado que el citoplasma es un lugar propicio para la proteólisis y FlgI debe ensamblarse en el periplasma, es probable que por ello necesite a la chaperona FlgA (Nambu y Katsukake, 2000). Por otro lado, FlgM es un factor anti-sigma bien conservado en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esta proteína mantiene al factor sigma-28 inactivo hasta que se completa la formación del gancho y del cuerpo basal flagelar; en este punto de la biogénesis flagelar la proteína FlgM se secreta al medio de cultivo, y sigma-28 puede iniciar la transcripción de los genes flagelares tardíos (Poggio *et al*, 2005). RSP_6087 está conservada en las cepas de *R. sphaeroides* ATCC 17029, ATCC 17025, KD131, así como en *Loktanella vestfoldensis*. Estudios no publicados indican que la ausencia de RSP_6087 no afecta la formación del flagelo ni la capacidad para rotarlo (Teresa Ballado, comunicación personal).

En este trabajo nos propusimos determinar si la proteína codificada por RSP_6086 es relevante para la formación y/o el funcionamiento del flagelo de *R. sphaeroides*.

Hipótesis.

La proteína codificada por el marco abierto de lectura RSP_6086 (FlgT) forma parte del estator flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*.

Objetivo general:

Determinar la función de la proteína codificada por RSP_6086 (FlgT) en el flagelo de *R. sphaeroides*.

Objetivos particulares:

Construir una mutante nula en RSP_6086 (*flgT*) y determinar su fenotipo.

Determinar la localización de la proteína codificada por RSP_6086 (FlgT).

Caracterizar la función de la proteína codificada por RSP_6086 (FlgT), diseñando los experimentos apropiados con base en el fenotipo observado.

Resultados

Análisis de la secuencia codificada por RSP_6086

RSP_6086 sólo tiene homólogos en otras cepas de *R. sphaeroides*, en *L. vestfoldensis* y no se han realizado estudios para conocer su función. Sin embargo, un análisis mediante PSI-BLAST hecho contra la proteína codificada por RSP_6086, arrojó FlgT de *Pseudoalteromonas* sp. y otras proteínas hipotéticas. Una segunda iteración arrojó FlgT de *V. alginolyticus*. Esto sugiere que la proteína podría ser un homólogo distante de FlgT, pero que un alineamiento simple no revela la relación entre ellas.

Sin embargo, al hacer una predicción de la estructura terciaria de RSP_6086, nombrada FlgT a partir de ahora, se observó una estructura muy similar a la de FlgT de *V. alginolyticus*, la cual como se menciona líneas arriba, se elucidó recientemente a una resolución de 2.0-Å (Terashima *et al*, 2013). FlgT de *R. sphaeroides* se compone de 361 aminoácidos y un análisis informático hecho con SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) revela que tiene la firma de aminoácidos conservados necesarios para ser exportado al periplasma mediante el sistema de secreción Sec. El sitio de corte ocurriría teóricamente en el residuo 23, dando como resultado una proteína madura de 338 residuos.

FlgT sólo se ha sido descrita en *Vibrio alginolyticus* y en *Shewanella*, especies que son impulsadas mediante Na⁺ (Terashima *et al*, 2010). Sin embargo, *R. sphaeroides* se mueve gracias a la fuerza protón motriz (Packer *et al*, 1994, Martínez del Campo *et al*, 2011). Hasta la fecha, no se ha observado la presencia ni la función de FlgT en algún organismo cuyo flagelo

sea impulsado por el gradiente electroquímico. Por esta razón, se decidió analizar en detalle el papel de FlgT.

La ausencia de FlgT genera un fenotipo paralizado

Para comenzar a caracterizar FlgT, se generó una mutante por interrupción introduciendo el cassette de resistencia a espectinomicina *aadA*. Dicha cepa, denominada SF3, se inoculó en cajas de agar suave al 0.19% con el fin de evaluar su capacidad de nado. Como se muestra en la figura 7B, la cepa fue incapaz de nadar. Para corroborar este resultado, la cepa se complementó *en trans* con el alelo silvestre FlgT a partir del plásmido de expresión pRK415. Como se observa en la figura 7B, la cepa complementada recuperó totalmente la capacidad de nado, lo cual indica que el fenotipo es provocado únicamente por la ausencia de FlgT.

Para discernir si la falta de nado es el resultado de la ausencia de flagelo (fenotipo Fla⁻) o de la imposibilidad para rotarlo (fenotipo Mot⁻), se desarrollaron tres estrategias. La primera consistió en un ensayo de inmunodetección con un anticuerpo policlonal α -FliC (-proteína que conforma la flagelina), para indagar si la síntesis y la exportación de flagelina no eran afectadas por la ausencia de FlgT. El resultado mostró que se exportan aproximadamente las mismas cantidades de flagelina en la cepa silvestre WS8 y en la cepa $\Delta flgT::aadA$ (Figura 7D). La segunda estrategia consistió en observar bajo el microscopio electrónico de transmisión (MET) la presencia de flagelos ensamblados correctamente en la cepa $\Delta flgT::aadA$. Nuevamente, como se aprecia en la figura 7C, se encontraron flagelos de apariencia silvestre en la cepa $\Delta flgT::aadA$. Además, para determinar si existe un defecto en el ensamblaje del

flagelo o si el flagelo se libera al medio extracelular como ocurre en *V. alginolyticus* o *V. cholerae*, respectivamente (Terashima *et al*, 2010; Martinez *et al*, 2010), se determinó el número de flagelos anclados al cuerpo celular tras una tinción con DAPI. No se encontraron diferencias sustanciales entre el número de flagelos anclados a la cepa silvestre y la cepa $\Delta flgT::aadA$ (datos no mostrados). Con estos resultados, se concluyó que el fenotipo de la cepa $\Delta flgT::aadA$ es Mot, lo cual quiere decir que se forma un flagelo de apariencia normal, pero que es incapaz de rotar.

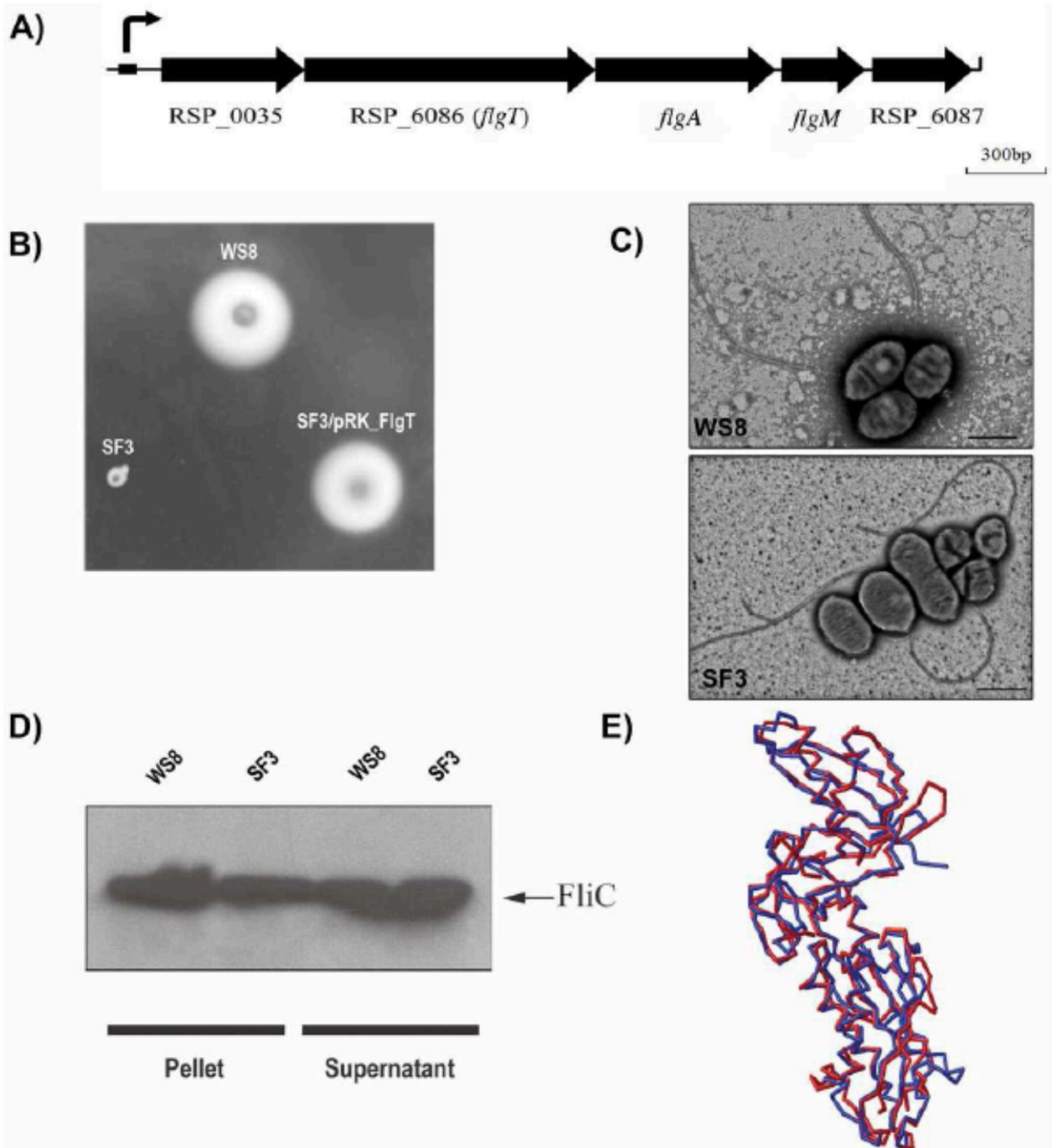


Figura 7. Contexto genético, fenotipo de la cepa mutante SF3 ($\Delta flgT::aadA$) y comparación de la estructura terciaria con FlgT de *V. alginolyticus*. A) Arreglo genético del operón flagelar que contiene a RSP_6086 (*flgT*). Las flechas indican la dirección de la transcripción genética. La caja negra indica la región regulatoria que contiene el promotor dependiente de s-54 previamente caracterizado. La flecha arriba de la caja negra simboliza la transcripción desde este promotor. B) Caja de nado inoculada con las cepas indicadas. C) Micrografía electrónica de células WS8 y SF3 que muestran la presencia de filamentos flagelares; barra= 1 μ M D) Las fracciones de pastillas y sobrenadantes obtenidas tras agitación vigorosa mediante vórtex de las cepas WS8 y SF3 fueron analizadas por inmunodetección usando anticuerpos α -FlhC. E) Predicción de la estructura terciaria de FlgT de *R. sphaeroides* superimpuesta con la estructura de FlgT de *V. alginolyticus*.

FlgT es una proteína periplásmica

Los análisis *in silico* hechos con el servidor Transmembrane Domain (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), revelaron que FlgT tiene la firma de aminoácidos conservados necesarios para ser reconocida por el sistema de secreción Sec, el cual la enviaría al espacio periplásmico. El sitio de corte predicho se encuentra en el aminoácido 23, lo que resultaría en una proteína madura y exportada de 337 residuos. Para corroborar experimentalmente que FlgT se encuentra en el periplasma, se generaron anticuerpos policlonales contra la proteína FlgT_{-His6} en ratones hembras de la cepa Balb^c. Posteriormente, se realizó un ensayo de acceso a proteasas, el cual consiste en degradar la pared con lisozima y generar esferoplastos. Después, los esferoplastos se someten a un tratamiento con proteinasa K, la cual degradará todas las proteínas que aún se encuentren expuestas después del tratamiento inicial con lisozima, es decir, las proteínas que tengan localización periplásmica, así como las regiones extracelulares de las proteínas de membrana. Las muestras tratadas se

analizaron mediante Western blot. En la figura 8A se observa que FlgT se degrada tras la adición de proteinasa K, lo cual demuestra que sí se localiza en el espacio periplásmico. Como control, utilizando el anticuerpo α -FliH, se verificó que en las muestras la cantidad de la proteína citoplásmica FliH (parte del aparato de exportación tipo III) no sufriera cambios a pesar de la presencia de la proteinasa K.

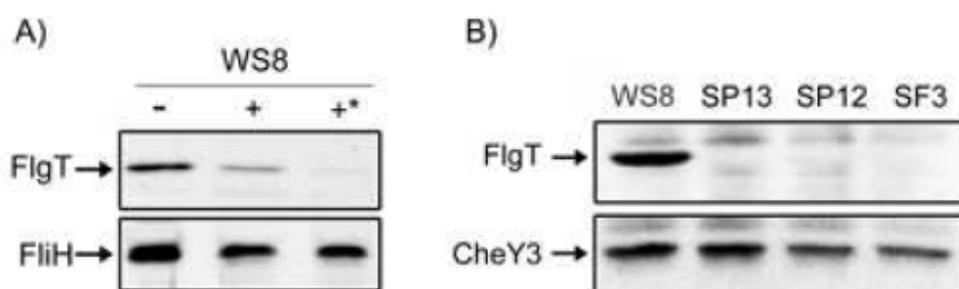


Figura 8. Localización subcelular y expresión de FlgT en diferentes cepas. A) La presencia de FlgT en el periplasma de células silvestres se analizó mediante un ensayo de sensibilidad a proteasas. Se obtuvieron esferoplastos de un cultivo de 15 mL de células WS8 en fase exponencial ($OD_{600}=0.8$) mediante tratamiento con lisozima y EDTA. Los esferoplastos se incubaron con proteinasa K (100 μ g/mL durante 20 (+) y 40 (+*) min. Se incluyó un control sin proteinasa K y se incubó con amortiguador Tris por 40 min (-). Las muestras resultantes que contenían 5 mg de proteína se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos específicos. Como control, las mismas muestras se analizaron para observar la presencia de la proteína citoplásmica FliH. B) 5 mg de extractos totales celulares de las cepas indicadas, se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos α -FlgT o α -CheY.

FlgT se expresa en la jerarquía flagelar

Para determinar si *flgT* pertenece o no a la jerarquía flagelar, realizamos un ensayo de Western blot para detectar FlgT en las cepas SP12 ($\Delta fleT1::aadA$) y SP13 ($\Delta fleQ1::Kan$). FleQ es el regulador maestro de los genes flagelares en *R. sphaeroides* y activa la expresión del operón de la clase II flagelar *fleT-fliFGHIJ*. FleT y FleQ juntos activan la clase flagelar III, que incluye la mayoría de los genes del cuerpo basal, el aparato de exportación, el gancho y los factores de regulación σ_{28} (FliA) y anti- σ_{28} (FliM) (Poggio *et al*, 2005).

Como se puede apreciar en la figura 8B, FlgT se detectó en extractos celulares de la cepa silvestre, pero no en los extractos de las cepas SP12 y SP13. Esto sugiere que *flgT* pertenece a la jerarquía flagelar y que su expresión depende de FleQ y FleT. CheY3 es una proteína quimiotáctica que se expresa a partir de un promotor σ_{70} , por lo que la concentración de esta proteína debería ser similar en estas cepas, por lo tanto, como control utilizamos los mismos extractos para el análisis de Western blot pero usando un anticuerpo α -CheY3. Las cantidades de esta proteína no sufrieron cambios, validando así nuestras observaciones. Para descartar que FlgT fuera inestable en los fondos genéticos SP12 y SP13, realizamos un análisis de Western blot de extractos totales de las cepas SP12 y SP13 expresando *flgT* desde el promotor *lac* del plásmido pRK415. No se encontraron diferencias en la cantidad de FlgT entre estas cepas y la cepa silvestre (resultados no mostrados).

FlgT interactúa con las regiones periplásmicas de FliL y MotB

Al saber con certeza que FlgT se localiza en el periplasma y que su delección provoca un fenotipo Mot-, presumimos que otras proteínas involucradas en la rotación flagelar, tales como FliL, MotB o MotF podrían interactuar con FlgT. Para probar esta idea, realizamos un ensayo de co-precipitación con las regiones periplásmicas de las proteínas transmembranales MotB y FliL fusionadas a la proteína GST (Glutación S-transferasa) como carnada y FlgT_{His6} como presa. Como control negativo usamos la proteína GST. El ensayo reveló una interacción positiva entre FliL y FlgT, así como entre MotB y FlgT.

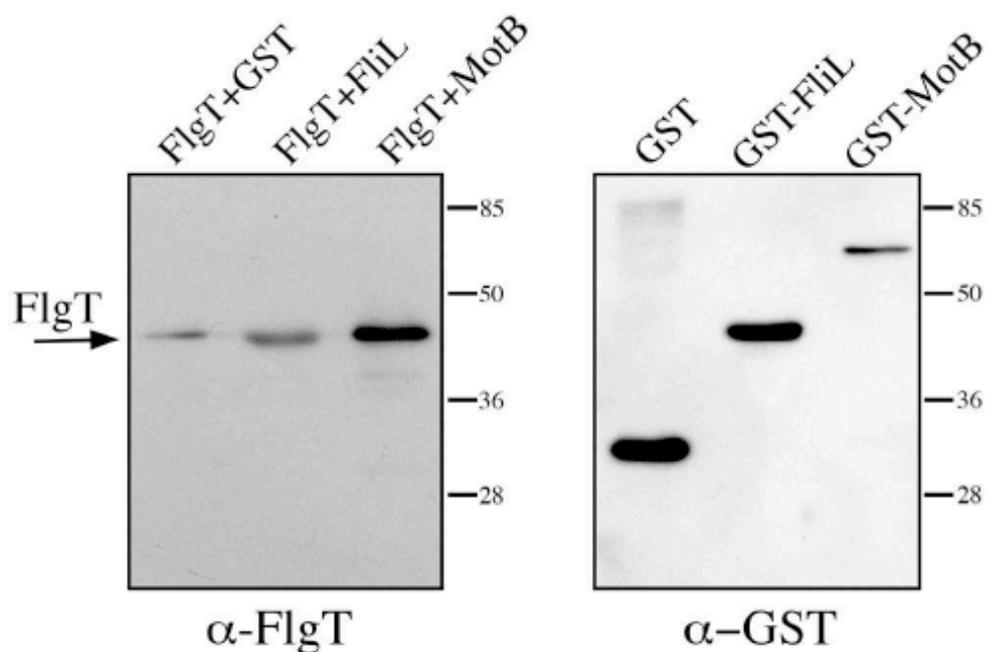


Figura 9. Interacciones de FlgT probadas mediante co-precipitación. Co-precipitación de FlgT-His6X con GST sola (29 kDa), GST-FliL (48 kDa) y GST-MotB (63 kDa). Tras la coprecipitación, la muestra se dividió en dos y se analizó con anticuerpos α -FlgT y α -GST mediante inmunodetección.

Las interacciones detectadas mediante el ensayo de co-precipitación, se confirmaron usando un ensayo de doble híbrido en levaduras. Para este experimento, fusionamos la forma madura de FlgT al dominio de unión de DNA del activador transcripcional de levaduras GAL4 (BD-FlgT), mientras que las regiones periplásmicas de MotB y FliL se fusionaron al dominio de activación de GAL4 (AD-MotB y AD FliL, respectivamente). Para el ensayo, los plásmidos que expresan las proteínas de fusión se transformaron en la cepa reportera AH109. En esta cepa, los genes HIS3 y ADE2 se encuentran bajo el control positivo de GAL4. Una interacción positiva acerca los dominios de unión al DNA (AD) y activación (BD) de GAL4 y esto activa la expresión de los genes HIS3 y ADE2, lo que promueve (basado en la fuerza de interacción) el crecimiento de las células AH109 en ausencia de histidina y/o adenina.

Como se observa en la figura 10, las cepas AH109 que co-expresan AD-MotB y BD-FlgT o AD-FliL y BD-FlgT, crecieron en la ausencia de histidina pero no en la ausencia de adenina. Esto confirma que FlgT interactúa con MotB y FliL, sin embargo también sugiere que la interacción es relativamente débil.

Utilizando el mismo ensayo, decidimos probar si FlgT interactúa consigo misma. Para ello fusionamos FlgT al dominio AD (AD-FlgT) y co-transformamos AD-FlgT y BD-FlgT en la cepa AH109. Como se aprecia en la figura, la cepa AH109 creció en ausencia de histidina y en ausencia de adenina, lo que indica una interacción fuerte.

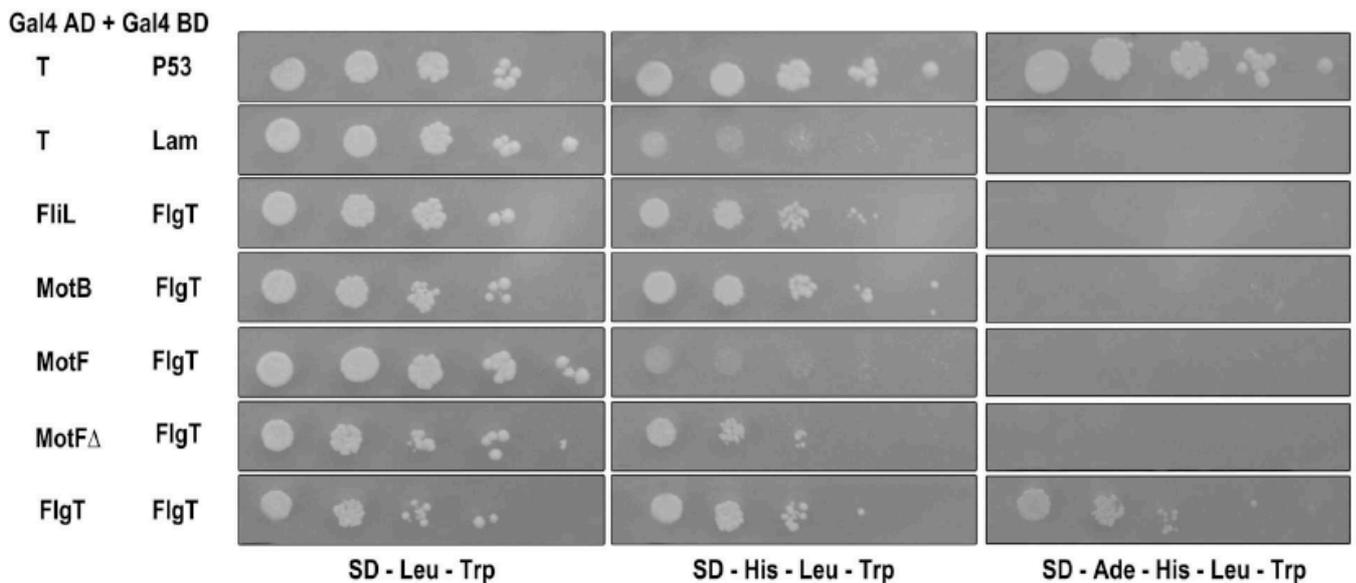


Figura 10. Interacciones de FlgT probadas por ensayos de doble híbrido. La cepa de levadura AH109 se transformó con los plásmidos indicados a la izquierda. Los pares AD-T y BD-P53 y AD-T y BD-Lam son los controles positivos y negativos, respectivamente. Se inocularon diluciones seriales de los cultivos de las células transformadas en cajas con medio de crecimiento indicado en la parte inferior, los cuales son medio sintético (SD) sin leucina (-Leu), triptófano (-Trp), histidina (-His) o adenina (-Ade). Las fotos se tomaron después de 10 días de incubación a 30°C.

FlgT interactúa con un fragmento de MotF

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que, además de FliL y MotA/B, se requiere la presencia de MotF para la rotación flagelar en *R. sphaeroides*. MotF es una proteína transmembranal de 270 residuos que tiene una gran región periplásmica y que sólo se encuentra en las cepas de *R. sphaeroides* 2.4.1., WS8, KD131, ATCC 17029 y ATCC 17025 (Ramírez-Cabrera *et al*, 2012). Para probar la interacción entre FlgT y MotF, clonamos el dominio periplásmico de MotF (MotFp) fusionado al dominio de interacción de GAL4 (AD-MotFp). El plásmido que expresa esta proteína de fusión se co-transformó junto con BD-FlgT

en la cepa AH109. La cepa de levadura resultante, no fue capaz de crecer en ausencia de histidina o adenina, lo cual indica que estas proteínas no interactúan (Figura 10). Una versión de MotF que porta una deleción en la región adyacente al dominio transmembranal (MotFp Δ 77-98), también se incluyó en este ensayo. Se ha observado previamente que esta región de MotF es esencial para la rotación flagelar y también para la localización adecuada de GFP-MotF (Ramírez-Cabrera *et al*, 2012). Como se observa en la figura 10, la cepa AH109 co-transformada con AD-MotFp Δ 77-98 y BD-FlgT, fue capaz de crecer en ausencia de histidina, lo que sugiere que MotF interactúa con FlgT y que los residuos 77-98 entorpecen esta interacción.

FlgT estabiliza la localización de MotF

La interacción positiva entre MotF y FlgT, así como la interacción entre FlgT y FliLp, nos llevó a evaluar la localización de estas proteínas *in vivo*. Nuestros esfuerzos por obtener una versión fluorescente de FlgT fueron infructuosos, ya que la fusión FlgT-mCherry fue indistinguible de la fluorescencia intrínseca de las células. Igualmente, intentamos una versión de CFP que pudiera fluorescer en el periplasma para después fusionarlo a FlgT. Esto lo hicimos agregando una secuencia que debía ser reconocida por el sistema de translocación de las argininas gemelas (TAT), para que exportara CFP madura a periplasma y pudiera emitir fluorescencia en ese compartimento celular. Hay dos ejemplos específicos donde la estrategia de fusionar una proteína periplásmica a la proteína verde fluorescente (GFP), y agregar la firma que reconoce el sistema TAT para ser exportada hacia periplasma, fue fructífera (Thomas *et al*, 2001; Takekawa *et al*, 2013). En ambos casos, se realizaron con γ -proteobacterias: *E. coli* y *V. alginolyticus*. Para obtener una versión fluorescente de CFP en periplasma en *R. sphaeroides*, se amplificaron 130 bases del gen *dorA*, que es homólogo al gen de la reductasa TMAO *torA* (proteína periplásmica exportada por el sistema Tat) en *E. coli*

y *V. alginolyticus*. Posteriormente, la señal de *dorA* se fusionó a CFP y se clonó en el plásmido pRK415. Mediante conjugación se introdujo la construcción pRK/dorA-CFP a la cepa silvestre WS8, pero al analizar varias clonas bajo el microscopio, no pudimos observar emisión de fluorescencia en el periplasma. Mediante ensayos de sensibilidad a proteasa, determinamos que, efectivamente, la fusión dorA-CFP se mantenía en el citoplasma a pesar de poseer la señal para ser exportada a periplasma (datos no mostrados). Sin embargo, decidimos determinar la localización de GFP-FliL y GFP-MotF en la ausencia de FlgT (cepa SF3). Como se muestra en la figura 11, GFP-FliL formó un foco fluorescente tanto en la cepa silvestre como en la cepa SF3. Este patrón concuerda con lo que hemos reportado con anterioridad (Suaste *et al*, 2011), lo cual significa que FliL se localiza independientemente de la presencia de FlgT. Por otro lado, la fusión GFP-MotF formó un foco de fluorescencia en la cepa silvestre, lo cual concuerda con lo observado previamente (Ramírez-Cabrera *et al*, 2012), pero no se detectaron focos fluorescentes en la cepa SF3. Esto apunta a que se requiere de FlgT para reclutar a MotF a la base del flagelo. Para confirmar la expresión correcta de GFP-MotF en la cepa SF3, analizamos su expresión mediante Western blot. En la figura 11B se puede observar que en SF3, las cantidades de GFP-MotF y GFP-FliL son similares a las detectadas en las células WS8. Posteriormente, indagamos si la interacción entre FlgT y MotF podía ocurrir en ausencia de cualquier otra proteína flagelar, por lo que en el fondo genético $\Delta fleQ$, introdujimos *en trans* a GFP-MotF y FlgT en el plásmido inducible pMG171. No se formaron focos de fluorescencia, lo cual indica que se requieren de otras proteínas flagelares que sirvan de ancla para que se agrupe FlgT y ésta a su vez reclute a MotF. Adicionalmente, decidimos expresar FlgT desde un plásmido inducible en un fondo genético *flgT::aadA*, GFP-MotF. De esta manera, lograríamos visualizar mediante experimentos de *time-lapse* que al expresarse progresivamente FlgT, la fluorescencia emitida por GFP-MotF se comenzaría a agrupar a la base del flagelo. Esto demostraría *in vivo* la formación de focos de fluorescencia en presencia

de FlgT. Para ello, fusionamos FlgT al plásmido pIND, el cual posee un promotor inducible mediante IPTG y es específico para *R. sphaeroides* y *Paracoccus denitrificans* (Ind et al 2009). Sin embargo, al ver el efecto de la construcción *flgT::aadA* GFP-MotF/pIND-FlgT bajo el microscopio sin la adición de IPTG, observamos que ya se formaban los focos de fluorescencia emitidos por GFP-MotF. Esto seguramente se debe a la expresión *leaky* (o de escape) que reportan los autores que construyeron el plásmido pIND. Ellos apuntan que hay una mínima expresión basal de las proteínas fusionadas al plásmido, y esta mínima expresión parece ser suficiente para que las moléculas de FlgT formadas sin la adición del inductor, interactúen con GFP-MotF y se visualicen focos de fluorescencia en la base del flagelo (datos no mostrados).

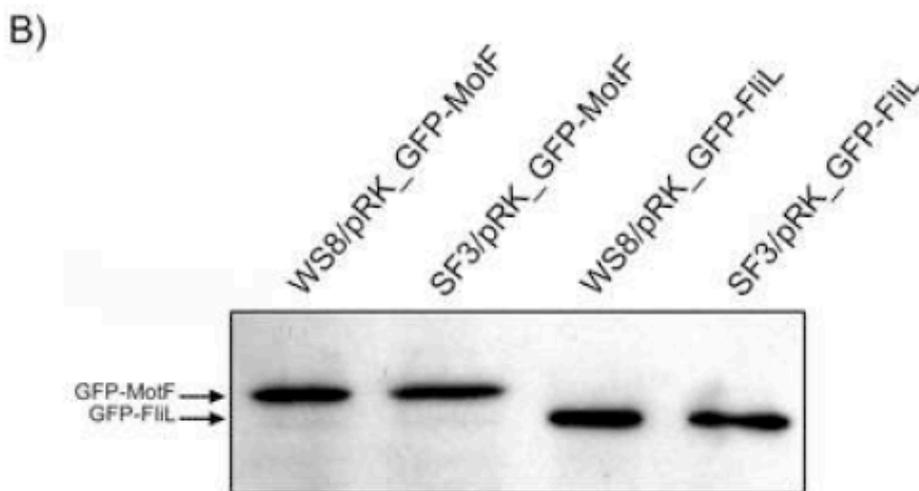
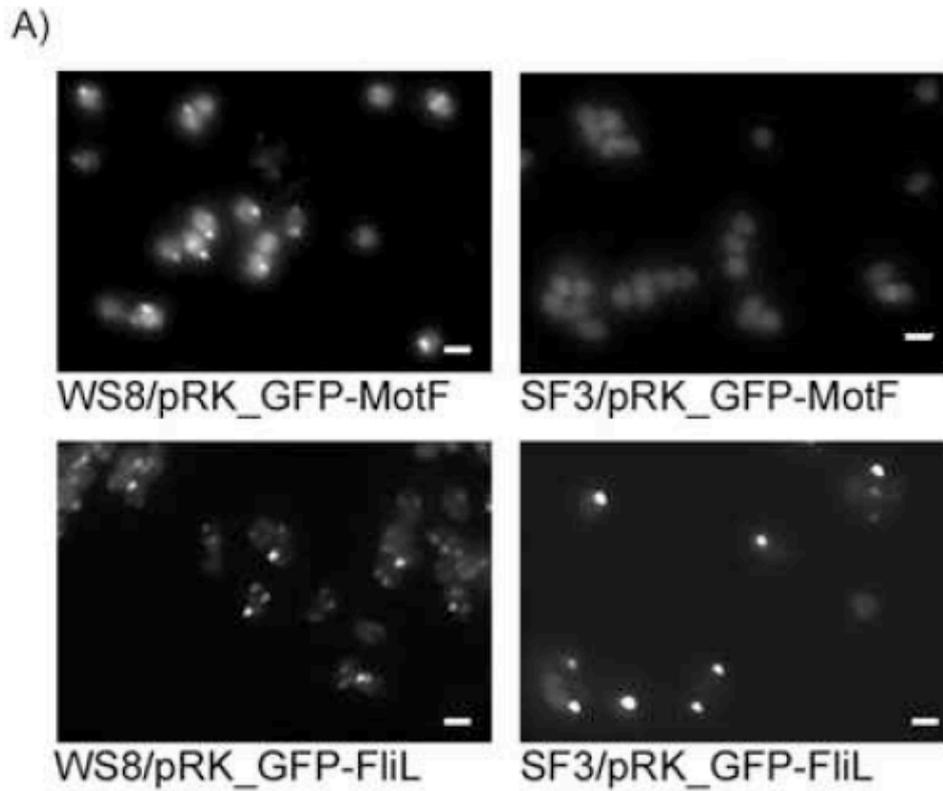


Figura 11. Localización de GFP-MotF y GFP-FliL en la cepa SF3. A) Imágenes representativas de GFP-MotF y GFP-FliL en cepas WS8 y SF3. Barra=1 μ M. B) Análisis de Western blot de GFP-FliL y GFP-MotF expresadas en las cepas WS8 y SF3. Un extracto total celular con 5 μ g de proteína se sometió a SDS-PAGE y fue analizado mediante Western Blot usando anticuerpos α -GFP.

Pseudorevertantes de *flgT* mapean en *motB*

Las mutantes supresoras proveen información indirecta pero valiosa para saber la función de una proteína. Para tener una noción más clara del papel de FlgT en la rotación flagelar, aislamos dos pseudorevertantes que restablecen la capacidad de nado de las células SF3. Para lograrlo, inoculamos cajas de Petri conteniendo 0.19% de agar con cultivos independientes de SF3 y se incubaron en una caja de humedad durante 10-14 días. Tras este periodo de tiempo, un pequeño halo de desplazamiento se detectó alrededor del punto de inoculación. Se aislaron y se purificaron las células de estos halos y su capacidad para desplazarse se probó en cajas de nado. Si bien las pseudorevertantes recuperaron la capacidad de desplazamiento, esta sólo fue de aproximadamente 50% en comparación con la cepa silvestre. Observaciones bajo el microscopio óptico de estas células, reveló que sólo el 20% de la población nadaba y que los individuos que se desplazaban lo hacían a una velocidad reducida. Mediante un sistema computacional de rastreo celular, pudimos determinar las velocidades de nado de las pseudorevertantes. La velocidad para las células SF5 fue de $8.6 \pm 3.3 \mu\text{M/s}$, mientras que para las células SF6 fue de $9.9 \pm 3.8 \mu\text{M/s}$. En contraste, la velocidad de la cepa silvestre es de $29 \pm 4.4 \mu\text{M/s}$.

Para identificar la mutación que le permitió a estas cepas recuperar la capacidad de nado, secuenciamos los genes *motA*, *motB*, *fliG*, *fliM* y *fliN*. Al comparar estas secuencias con la cepa silvestre encontramos un cambio único en el alelo *motB* en ambas supresoras. Las mutaciones puntuales reemplazaron residuos de serina y fenilalanina en las posiciones 62 y 63, por prolina y serina, cepas SF5 y SF6 respectivamente. Cabe hacer notar que ambas mutaciones afectan la región de MotB conocida como tapón o *plug*. Se ha propuesto que en *R. sphaeroides* la región del tapón comprende de los aminoácidos 56 al 67 (Suaste *et al*, 2010).

Previamente, varias pseudorevertantes aisladas de las cepas $\Delta motF::aadA$ y $\Delta fliL::aadA$ también mapearon en la misma región de *motB*. Anteriormente hemos propuesto que estos cambios modifican el tapón, lo cual provoca que el canal de protones se mantenga abierto, volviendo innecesaria la presencia de una proteína adicional para promover un cambio conformacional en MotB (Suaste *et al*, 2011, Ramírez-Cabrera *et al*, 2012).

Por lo tanto, si FlgT participa en la apertura del canal de protones, los alelos de *motB* aislados como supresores de $\Delta fliL3::aadA$ deberían rescatar el fenotipo silvestre de la cepa SF4 ($\Delta flgT::aadA$, $\Delta motB1::kan$). Para probar esta hipótesis, cinco de las ocho versiones mutantes de *motB* aisladas como alelos supresores de $\Delta fliL$ se expresaron en SF4, a partir del promotor *lacp* del plásmido pRK415. Cabe hacer notar que sólo se probaron 5 de 8 porque SUP1 y SUP7 tienen un cambio en el mismo residuo que SUP2 y SUP4, respectivamente, y SUP3 no se incluyó porque el nado que promueve en FS3 ($\Delta fliL3::aadA$) es mínimo (Suaste *et al*, 2011). Creemos que la función de MotB está comprometida por el cambio presente en SUP3 (MotB A56E) pues mapea en el límite de la predicción para una hélice transmembranal. Como se muestra en la figura 12, las versiones mutantes de *motB* restauraron la capacidad de nado de las células SF4, pero los halos de desplazamiento están drásticamente reducidos si se comparan con el halo de la cepa silvestre. La observación de estas cepas bajo el microscopio óptico, reveló que, tal y como ocurre en las cepas supresoras SF5 y SF6, sólo una pequeña población de las células nadaba; y lo hacía a una baja velocidad. Por lo tanto, concluimos que si bien los alelos supresores *motB* promueven el nado en las células SF4, la supresión no es tan eficiente como lo es para los alelos $\Delta fliL3::aadA$ y $\Delta motF::aadA$. Esto sugiere que FlgT debe tener una función adicional además del proceso de activación de MotB.

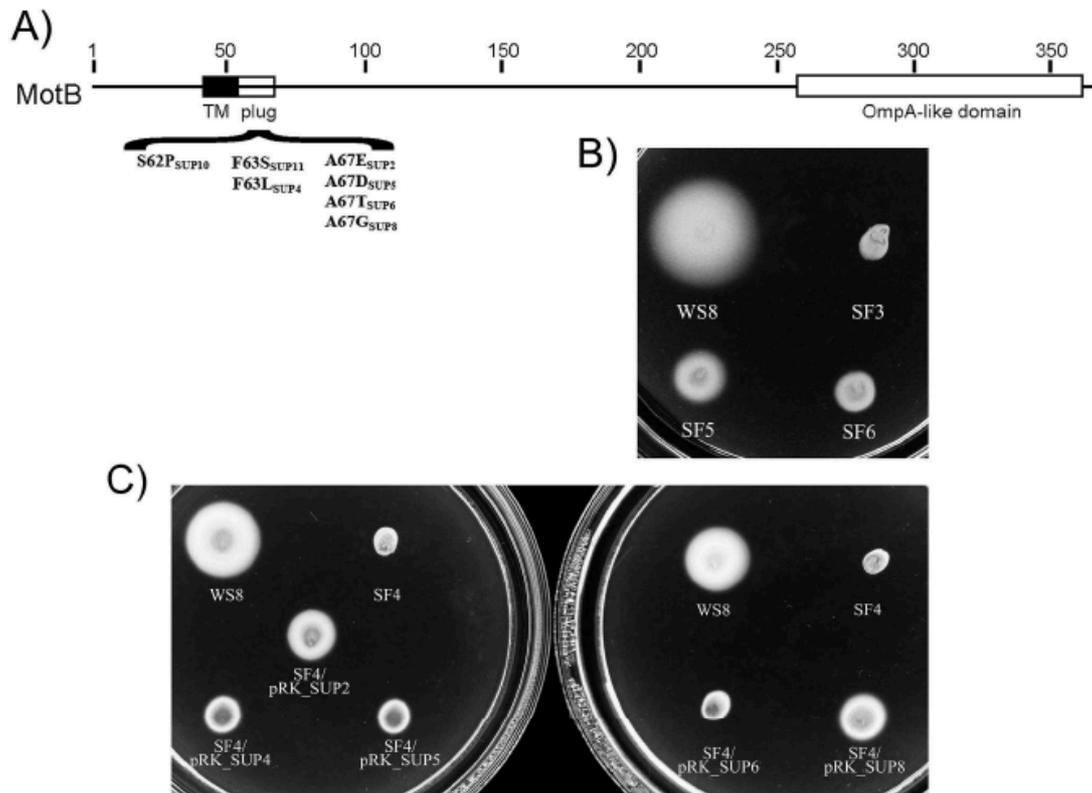


Figura 12. Mutaciones en MotB promueven el nado de la cepa SF3. A) Se muestra un mapa de la región codificante de MotB indicando las características relevantes. Caja negra: dominio transmembranral (TM); caja blanca con una línea negra en medio: región del *plug*; caja blanca: dominio OmpA-like. Se indican los cambios en cada supresora. B) Caja de nado inoculada con las cepas WS8, SF3, SF5 Y SF6. C) Cajas de nado inoculadas con las cepas WS8, SF4 Y SF4 expresando el alelo mutante indicado de *motB*.

FlgT se requiere para formar un anillo que cubre los anillos LP

Aislamos flagelos de células de la cepa silvestre WS8 y SF3, y los flagelos purificados se visualizaron bajo el microscopio electrónico de transmisión. En los paneles superiores de la figura 13A se pueden observar cuerpos basales de WS8 con un gran anillo que parece tener dos capas. Este anillo desaparece en los cuerpos basales de las células SF3, como se aprecia en los paneles inferiores de la figura 13A. Cabe hacer notar que los anillos LP son claramente visibles en esta cepa. El diámetro del anillo visto en la cepa silvestre es de 67 ± 10.7 nm, mientras que el diámetro de los anillos LP vistos en los cuerpos basales de la cepa SF3, es de 24 ± 1 nm. Análisis de Western blot en estas muestras revelaron la presencia de FlgT en los cuerpos basales de WS8, pero no en las purificaciones de SF3. Las mismas muestras se probaron contra anticuerpos α -MotF y α -FlgE como control de carga. Sólo se detectó MotF en las muestras obtenidas de WS8, lo cual sugiere que esta proteína es parte integral del cuerpo basal y que es estabilizada por FlgT.

El mismo anillo que cubre los anillos LP también está presente en cuerpos basales aislados de la cepa VR1 (*motF::aadA*); la presencia de FlgT se confirmó mediante Western blot. Este resultado sugiere de MotF no se requiere para el reclutamiento de FlgT al complejo gancho-cuerpo basal, o para la formación de esta estructura (resultados no mostrados).

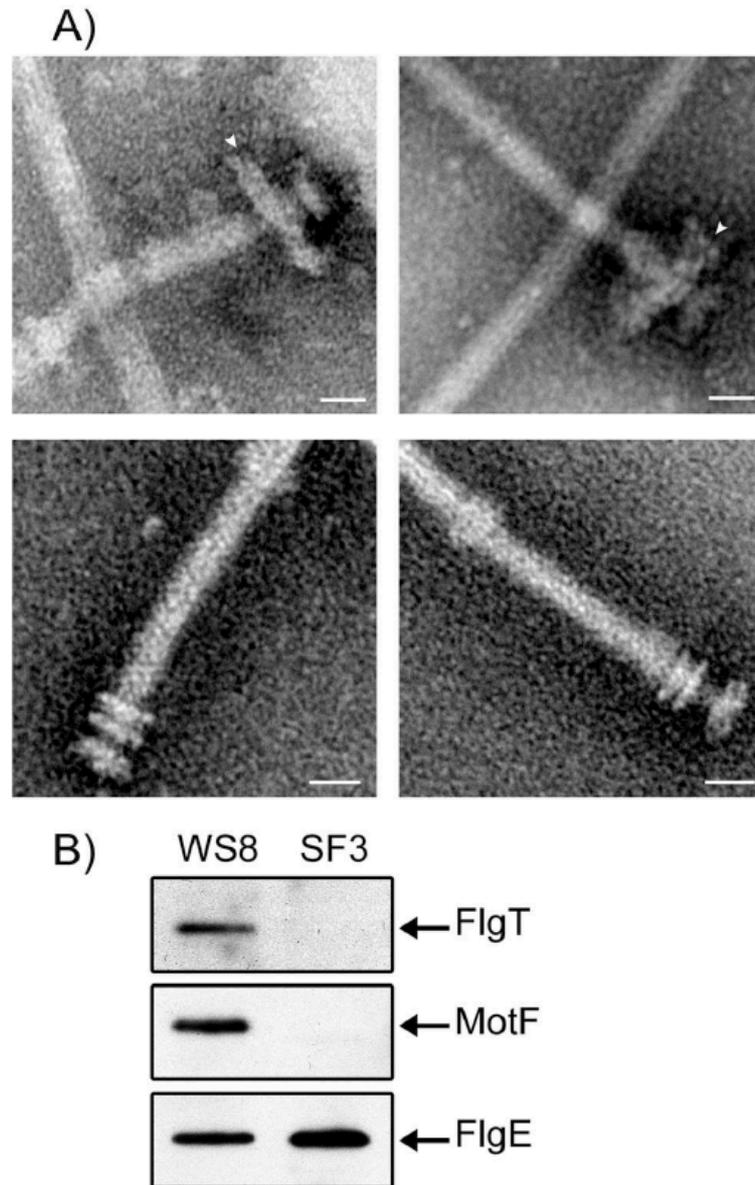


Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión y análisis de inmunodetección de cuerpos basales gancho-filamento (HBB) de las cepas WS8 y SF3. A) Imágenes de HBBs purificados de las cepas WS8 y SF3 (arriba y abajo, respectivamente). La línea blanca denota el anillo H. Barra= 20 nm. B) Análisis por Western blot de los cuerpos basales purificados de las muestras WS8 y SF3. Un décimo de la muestra de HBBs purificados se analizó usando anticuerpos específicos.

DISCUSION

R. sphaeroides tiene varios ORFs de función desconocida embebidos en el cluster flagelar Fla1. En este trabajo demostramos que uno de estos ORFs, RSP_6086, codifica para una proteína que es indispensable para la rotación flagelar. Esta proteína consta de 361 aminoácidos y muestra la presencia de un péptido señal, lo cual sugería su exportación hacia el periplasma mediante el sistema de secreción Sec. RSP_6086 está conservada en todas las especies de *R. sphaeroides* secuenciadas hasta la fecha y en algunas otras especies de la familia *Rhodobacteraceae*. Sin embargo, una búsqueda más sensible utilizando PSI-BLAST reveló que RSP_6086 codifica para una proteína que parece ser un homólogo distante de la proteína FlgT, previamente descrita en *V. cholerae* y *V. alginolyticus* (Cameron *et al*, 2008; Terashima *et al*, 2010). FlgT de *R. sphaeroides* muestra identidad de 17% con FlgT de *V. alginolyticus*. Pero los programas utilizados modelaron a FlgT de *R. sphaeroides* usando como templado la estructura tridimensional de FlgT de *V. alginolyticus* (Score TM= 0.91). Las pocas diferencias que se aprecian en las estructuras podrían ser el resultado de adaptaciones específicas de FlgT en *R. sphaeroides*. Por otro lado, el anillo observado en los cuerpos basales purificados de la cepa WS8, es muy parecido al anillo H formado por FlgT en *V. alginolyticus* (Terashima *et al*, 2010). En conjunto, estos datos sugieren que RSP_6086 sí es un homólogo de FlgT.

Anteriormente sólo se había descrito a FlgT en *Vibrio* y en diferentes especies de *Shewanella*, las cuales son γ -proteobacterias. A pesar de que es la primera vez que se describe a esta proteína en una clase diferente (α -proteobacteria), debemos recordar que FlgT pertenece al sistema flagelar Fla1 de *R. sphaeroides*, el cual fue adquirido mediante un

evento de transferencia horizontal de una γ -proteobacteria (Poggio *et al*, 2007). No obstante, esta es la primera vez que se describe a FlgT y al anillo H en un sistema flagelar impulsado únicamente por fuerza protón motriz y no por Na⁺. Anteriormente se reportó que *Shewanella oneidensis* MR-1, la cual codifica a FlgT en su genoma (GI:24374769), utiliza los estatores MotAB y PomAB simultáneamente, pero solo estos últimos son esenciales para el nado. (Paulick *et al*, 2009).

Hasta ahora, solo se había identificado a FlgT en bacterias con los alelos *motX* y *motY*, e incluso se había demostrado que el anillo H estabiliza a las proteínas MotX y MotY en el cuerpo basal de *V. alginolyticus* (Terashima *et al*, 2010, Terashima *et al*, 2013). *R. sphaeroides* no tiene genes similares a *motX* o *motY*, por lo que FlgT en esta bacteria podría ser importante para reclutar otras proteínas tales como MotF, MotB o incluso algunas otras proteínas de función desconocida. Es probable que en la ausencia de MotX y MotY, FlgT haya evolucionado a una tasa más alta, dando lugar a su bajo grado de conservación. El aislamiento de cuerpos basales en *R. sphaeroides* ya había sido reportado, sin embargo la presencia del anillo H pasó desapercibida (West y Dreyfus, 1997; Kobayashi *et al*, 2003).

Nuestro resultados sugieren que FlgT depende de las proteínas activadoras FleQ y FleT, lo que posiciona a este gen en la clase III de la jerarquía flagelar, o en la clase IV dependiente de FliA. Sin embargo, *flgT* parece ser el segundo gen de un operón que inicia con el gen *flgP*; dado que se ha demostrado que el promotor de este operón pertenece a la clase III, *flgT* también debería pertenecer a esta clase flagelar (Poggio *et al*, 2005).

En este trabajo mostramos que en la ausencia de FlgT, las células de *R. sphaeroides* son capaces de formar un flagelo de apariencia normal pero que es incapaz de rotar, lo que indica que esta proteína debe tener alguna función relacionada con el motor. En contraste con esta observación, en *V. alginolyticus* la ausencia de *flgT* reduce la flagelación y la motilidad, lo

que indica una clara divergencia en la función de estas proteínas (Cameron *et al*, 2008, Terashima *et al*, 2010, Terashima *et al*, 2013).

En concordancia con la idea de que FlgT de *R. sphaeroides* se requiere para la función del motor, hallamos que FlgT es capaz de interactuar con los dominios periplásmicos de MotB y FliL, lo que sugiere un papel directo en la activación y/o reclutamiento de los complejos del estator. Además, obtuvimos evidencia que sugiere la interacción de FlgT con MotF. Este resultado también se apoya por el hecho de que se requiere FlgT para reclutar a MotF a la base del flagelo. Se ha propuesto previamente que FliL y MotF podrían participar en la apertura del canal de protones, sin embargo no se detectaron interacciones entre las regiones periplásmicas de FliL y MotF con el dominio periplásmico de MotB. Nuestros resultados nos permiten proponer que FliL y MotF promueven la apertura del canal de protones a través de FlgT.

La interacción entre la región periplásmica de MotF y FlgT en el ensayo de doble híbrido sólo pudo detectarse cuando se usó una versión de MotF que carece de los aminoácidos 77-98. Dado que otros resultados presentados en este trabajo sugieren la interacción entre estas dos proteínas (Ver figuras 11 y 13), el efecto negativo que esta región de MotF ejerce en la interacción FlgT-MotF, puede reflejar un artefacto causado por la conformación que MotF adopta en la ausencia del ambiente gancho-cuerpo basal flagelar, o por alguna forma de regulación en la interacción entre estas dos proteínas.

Se desconoce la localización de MotF dentro de la estructura flagelar, empero nuestros resultados sugieren que es parte del cuerpo basal, y que debido a su interacción con FlgT presumiblemente forma parte de los componentes estáticos del flagelo.

También demostramos que una mutación en *motB* restaura de manera parcial el nado en las células SF3. Los cambios en MotB mapearon justo después del cruce transmembranal

de esta proteína. Varias mutaciones aisladas previamente como supresoras del fenotipo Mot- de las cepas $\Delta fliL3::aadA$ y $motF::aadA$, también se localizaron en esta región. Se ha propuesto que estos cambios modifican la región del tapón y como consecuencia el canal de protones permanece abierto, lo que hace dispensable la presencia de cualquier otra proteína que promueva un cambio conformacional en MotB (Suaste *et al*, 2010, Ramírez-Cabrera *et al*, 2012). Parece improbable que FlgT pudiera sólo requerirse para abrir el canal de protones, ya que los alelos mutantes *motB* no suprimen eficientemente el fenotipo de las células $\Delta flgT$. Se ha determinado previamente que los alelos mutantes *motB* que actúan como supresoras de segundo sitio en $\Delta fliL3::aadA$, pueden restaurar eficientemente el nado en la cepa $motF::aadA$; esto sugiere que estas mutaciones compensan los defectos de nado causados por la ausencia de *fliL* y *motF* a través de un mecanismo inespecífico. En este trabajo demostramos que las supresoras *motB* del alelo $\Delta fliL3::aadA$ fueron capaces de promover el nado en las células SF4, pero estas cepas mostraron un halo que fue de 70 a 30% más pequeño que el producido por las células WS8. Este resultado se contrapone con el efecto que estas versiones mutantes de *motB* ejercieron en la capacidad de nado en las cepas FS5 ($\Delta fliL3::aadA \Delta motB1::Kan$) y VR2 ($motF::aadA \Delta motB1::Kan$), donde la expresión de estos alelos promovieron un halo de nado que era sólo 28 a 1% más pequeño que el que forma la cepa silvestre (Suaste *et al*, 2010; Ramírez-Cabrera *et al*, 2012). Estos resultados sugieren que FlgT podría jugar un papel que va más allá de la apertura del canal de protones. Como lo sugiere la interacción entre FlgT y MotB, esta función podría estar relacionada con el reclutamiento o la estabilización de los complejos MotA/B.

Sin duda, la interacción del complejo del estator con otra estructura flagelar debe ser robusta y otros componentes flagelares podrían participar para estabilizar los complejos del estator. Se ha demostrado en *Salmonella* que las interacciones entre MotA y FliG son importantes para el ensamble de los complejos del estator (Morimoto *et al*, 2013). Usando un

acercamiento de entrecruzamiento por formación de puentes disulfuro, se ha sugerido que FlgI (que forma el anillo P) en *E. coli* interactúa con MotB (Hizukuri *et al*, 2010). Además, a partir de experimentos de co-localización en *V. alginolyticus*, se sugirió que MotX y MotY podrían interactuar con los complejos del estator. Estos ejemplos sugieren que MotA y MotB interactúan con el motor flagelar utilizando más que un solo blanco. Esto probablemente permite un mejor desempeño del motor o niveles adicionales de control. MotB en *R. sphaeroides* podría reclutarse o estabilizarse al motor flagelar a través de sus interacciones con FlgT, pero deben existir otras interacciones para poder explicar el débil nado de la cepa *flgT::aadA* complementada con los alelos mutantes de *motB*.

Además, es conveniente hacer notar que aunque FlgT interactúa con FliL, la ausencia de FlgT no afectó el patrón de localización de GFP-FliL, lo cual sugiere que FliL debe interactuar con al menos otro componente flagelar que mantiene su patrón de localización normal incluso en la ausencia de FlgT. Esto indica que FliL y MotF podrían tener papeles diferentes en la apertura del canal de protones. Nuestros esfuerzos por generar una versión fluorescente de FlgT fueron infructuosos, ya que al fusionar a CFP-FlgT con una secuencia que es reconocida por el sistema de las argininas gemelas (Tat) no obtuvimos focos de fluorescencia en el periplasma. Esto contrasta con estudios recientes donde, usando la misma estrategia, se han podido visualizar proteínas periplásmicas en *E. coli* y *V. alginolyticus* (Thomas *et al*, 2001; Takekawa *et al*, 2013). Es probable que el sistema de reconocimiento Tat en *R. sphaeroides* difiera sutilmente de *E. coli* y *V. alginolyticus*, y que esto haya impedido la obtención de una versión de FlgT fluorescente. Un acercamiento alternativo habría sido la visualización de la formación de focos fluorescentes mediante *time lapse* de GFP-MotF en cantidades crecientes de FlgT. Sin embargo, la expresión basal del plásmido pIND-FlgT sin inductor fue suficiente para que se formaran los focos de fluorescencia.

Cómo interactúan FlgT, FliL y MotF con MotB para activar la apertura del canal de protones es aún una pregunta abierta, y es posible que otras proteínas pudieran intervenir en este proceso que las diferentes bacterias han adaptado para cubrir sus necesidades. Es importante recordar que *Shewanella* y *Vibrio* son especies marinas, mientras que *R. sphaeroides* habita aguas continentales. Esto podría dar una pista para elucidar por qué *R. sphaeroides* es la primera bacteria descrita impulsada por protones que tiene anillo H. En promedio, la cantidad de sales disueltas en el océano es de 3.5%, mientras que en aguas continentales es de <0.2%. Esto implica que el Na⁺ disponible en los ecosistemas que habita *R. sphaeroides* es mucho menor que el disponible en el océano. Utilizar H⁺ en lugar de Na⁺ para impulsar el motor flagelar, es una adaptación al nicho ecológico que habita *R. sphaeroides*.

CONCLUSIONES

- I. RSP_6086 de *R. sphaeroides* es un homólogo de FlgT de *V. alginolyticus*.
- II. FlgT en *R. sphaeroides* es una proteína periplásmica y es indispensable para el nado.
- III. FlgT interactúa con MotB, FliL y una versión trunca de MotF.
- IV. FlgT es indispensable para agrupar a MotF a la base del flagelo.
- V. FlgT forma un gran anillo que recubre a los anillos LP.
- VI. La ausencia de FlgT no disminuye la fuerza de unión del flagelo al cuerpo celular, como ocurre en *V. cholerae* y *V. alginolyticus*.
- VII. Una mutación puntual en *motB* es suficiente para recuperar parcialmente el nado en la cepa *flgT::aadA* de *R. sphaeroides*.
- VIII. La función de MotF, FliL, MotB y FlgT está asociada al paso de protones que genera el movimiento del motor.

Materiales y métodos

Plásmidos, cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Los plásmidos y las cepas bacterianas usadas en esta trabajo están listadas en la tabla 1. *R. sphaeroides* WS8 (Socket *et al*, 1990) se creció en medio mínimo de Siström (Siström, 1962) a 30°C en la oscuridad con agitación constante a 200 rpm. *E. coli* se creció en medio LB a 37°C. Los ensayos de nado se realizaron con bacterias creciendo en medio líquido o en cajas de nado con medio mínimo de Siström y 0.19% de agar. Los antibióticos se agregaron en las siguientes concentraciones cuando fue necesario: para *R. sphaeroides*, kanamicina (25 µg/mL), tetraciclina (1 µg/mL) y espectinomicina (50 µg/mL); para *E. coli*, kanamicina (25 µg/mL), espectinomicina (50 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL). *Sacharomyces cerevisiae* se creció a 30°C en medio YPDA (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, y 0.003% de adenina), o en medio mínimo sintético definido (SD) (Clontech) complementado con los suplementos apropiados.

Oligonucleótidos. Los oligonucleótidos usados en este trabajo están listados en la tabla 2.

Aislamiento de cepas mutantes. La cepa SF3 se obtuvo por una doble recombinación homóloga sustituyendo el alelo silvestre en células WS8 por el alelo *flgT::aadA*. Para ello, *flgT* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos RSP0035B y ORF12; el producto de esta reacción se clonó en el plásmido pTZ19R BamHI -. Este plásmido se nombró pTZ_ *flgT*. El gen *aadA* se obtuvo mediante PCR como una región interna del cassette omega-Spc^r que removió la señal conocida de la terminación transcripcional usando el plásmido pWM5 como templado (Metcalf y Wanner, 1993). El producto de PCR que contenía el gen *aadA* se clonó entre los sitios BamHI de pTZ_ *flgT* que están localizados 9 pares de bases alejados dentro de la región de *flgT*. Finalmente, el fragmento que porta el alelo *flgT::aadA* se

subclonó en pJQ200 mp18 (Quandt y Haynes, 1993) y se introdujo a WS8 mediante conjugación (Davis *et al*, 1998) con la cepa S17-1 (Simon *et al*, 1983). Los eventos de doble recombinación se seleccionaron como ya se describió previamente (Davis *et al*, 1998). La cepa SF4 se aisló mediante la conjugación entre SF3 y S17-1 que portaba un derivado de pJQ200 con el alelo $\Delta\text{motB1}::\text{Kan}$ (Suaste *et al*, 2010).

Ensayos de movilidad. Una muestra de 3 μL de un cultivo en fase estacionaria se depositó en la superficie de cajas Petri que contenían medio mínimo de Sistro con 0.19% de agar. El nado se evaluó tras 48 hrs. de incubación en una cámara de humedad a 30°C. Las células nadadoras se observaron por microscopía de campo oscuro usando una muestra de 3 μL en fase exponencial ($\text{OD}_{600}=0.8$) crecida aeróbicamente en medio mínimo de Sistro.

Detección de FliC en el sobrenadante y en la fracción celular. *R. sphaeroides* se creció heterotróficamente hasta fase exponencial, cuando el cultivo alcanzó una $\text{OD}_{600}=0.8$, una muestra de 1 mL se transfirió a un tubo eppendorf; tras una agitación vigorosa mediante vórtex, la muestra se centrifugó antes de ser precipitar las proteínas solubles mediante la adición de TCA a una concentración final de 25%. Posteriormente se centrifugaron a 4°C por 15 min a 13,000 rpm. La pastilla celular y las proteínas precipitadas por TCA se resuspendieron en 100 μL y 20 μL de amortiguador, respectivamente. 10 μL de estas muestras se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos $\alpha\text{-FliC}$.

Detección de FlgE en el sobrenadante y en la fracción celular. *R. sphaeroides* se creció heterotróficamente hasta fase exponencial, cuando el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600}=0.8$, una muestra de 1.5 mL se transfirió a un tubo eppendorf. La muestra se centrifugó dos veces a 3,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se sometió a otra centrifugación a 13,000 rpm. Las proteínas solubles se precipitaron como se señaló previamente. La pastilla celular y las proteínas precipitadas con TCA se resuspendieron en 150 μL y 15 μL de amortiguador de

carga Laemmli, respectivamente. 10 μ l de estas muestras se analizaron por Western blot usando anticuerpos α -FlgE.

Predicción de estructura terciaria de FlgT. El servidor I-Tasser se usó para generar modelos estructurales potenciales de FlgT (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (refs)

Construcciones plasmídicas usadas en este trabajo. pRK_flgT se obtuvo clonando *flgT* en pRK415 (Keen *et al*, 1998). Para realizar esta construcción, *flgT* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos pRK6086F y pRK6086R. El producto de 1360 pb se clonó en pRK415 como un fragmento XbaI-EcoRI. En esta construcción, *flgT* se transcribe desde el promotor *lacp* presente en pRK415. Para obtener pBAD/Myc-HisA-FlgT, se obtuvo un producto de PCR que comprende del nucleótido 61 al 1083 mediante los oligonucleótidos pBADmyc6086SPS-fw y pBADmyc6086SPS-rv. El producto de 1023 pb se purificó y se clonó en pBAD/Myc-HisA. El plásmido final expresa la proteína madura FlgT (aminoácidos 21 a 361) fusionado al C-terminal His_{6x}-tag. Los plásmidos que se utilizaron para el ensayo de doble híbrido en levaduras se describen en la sección correspondiente. Para obtener la construcción pIND-FlgT, se amplificó FlgT con los oligos pIND 6086 completo FW y 6086/pIND RW. El producto de 1089 pares de bases se clonó en el plásmido pIND usando el sitio de restricción BglII y después BamHI para buscar la orientación correcta de la construcción. pRK/DorA-CFP se obtuvo amplificando la secuencia señal de *dorA* de *R. sphaeroides*, usando los oligos DorAF1 EcoRI y DorAR1 Apol. El producto es de 130 pb. También se amplificó la proteína CFP con los oligos cfpF1 Apol y cfpR1 SacI, obteniendo un producto de 714 pb. Cuando se tuvieron ambos productos de PCR puros, se digirieron con Apol y se ligaron para tener un producto final de 844 pb. Posteriormente, esta construcción se clonó en el plásmido pRK415,

se conjugó con en la cepa WS8 y se observó bajo el microscopio de fluorescencia con el filtro adecuado.

Ensayo de sensibilidad a proteasas. Un cultivo de *R. sphaeroides* se creció hasta fase exponencial ($DO_{600}=0.8$) y las células se colectaron mediante centrifugación a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Después se lavaron las células dos veces con Tris-HCl 10 mM (pH 7) y se resuspendieron en 500 μ L de 100 mM Tris-HCl/20% sacarosa. En este momento se tomó una muestra como control (50 μ L). Se obtuvieron esferoplastos mediante la adición de EDTA y lisozima a una concentración final de 50 μ M y 0.1 mg/mL, respectivamente. Tras 15 min de incubación a 37°C, se dividió en dos la suspensión celular y se agregó amortiguador Tris-HCl 100 mM (pH 7) o proteinasa K a una concentración de 100 μ g/mL. Las mezclas se incubaron a 37°C por 10 y 20 min. Para detener la reacción, se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonyl (PMSF 5 mM) y 1X de un coctel inhibidor de proteasas (Tabletas de coctel inhibidor de proteasas completo, mini, sin EDTA, Roche). Posteriormente, las muestras se incubaron 10 min más antes de ser hervidas en amortiguador Laemmli 1X. Las muestras se analizaron por inmunodetección con anticuerpos policlonales contra FlgT.

Sobre expresión y purificación de proteínas. La cepa de *E. coli* LMG194 que porta el plásmido pPIRL (ref) se transformó con pBAD/Myc-His-FlgT. Un cultivo de toda la noche fue diluido en medio fresco e incubado a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600}=0.5$. Llegando a este punto, se agregó arabinosa a una concentración final de 0.2%. Después de tres horas de incubación, se colectaron las células y se resuspendieron en medio TGED (0.01 M de Tris-HCl pH7.9, 15% de glicerol, 0.1% de EDTA y 1 mM de DTT). Se agregó lisozima a una concentración final de 0.2 mg/mL y la mezcla se incubó por 30 min en hielo. Luego, la suspensión celular se sonicó en hielo usando 3 ciclos de 10-s. Los remanentes celulares se removieron mediante al menos tres pasos de centrifugación (14,000 rpm por 5 min), y el

sobrenadante se mezcló con perlas de agarosa acopladas con Ni-nitrilotriacético (Ni²⁺-NTA) e incubadas por 1 h en hielo, agitando el tubo esporádicamente. La mezcla se usó para cargar una columna de polipropileno y se lavó con 50 volúmenes de amortiguador TGED con 10 mM de imidazol. La proteína se eluyó con amortiguador TGED con 100 mM de imidazol. GST-MotBp y GST-FliLp se purificaron usando los plásmidos y protocolos reportados previamente (Suaste *et al*, 2010).

Anticuerpos α -FlgT. Se generaron anticuerpos policlonales en ratones hembras BALB/c contra FlgT-His_{6x} como se ha reportado previamente (Harlow y Lane, 1998).

Inmunodetección. Las proteínas se separaron mediante SDS-12% PAGE (Laemmli, 1970), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con los anticuerpos apropiados después de bloquear con leche 5%-PBS. Después la membrana se incubó por dos horas con anti-FliC (1:30,000), anti-FliH (1:5000), anti-GST (1:20,000) (Pierce/GE), anti CheY3 (1:10,000), anti-GFP (1:5000), anti-FlgE (1:10,000), anti-MotF (1:5000) o anti-FlgT (1:5000) gama globulinas. La detección se realizó con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa y CDP-Star (Applied biosystems). La cantidad de proteína cargada para cada detección se indica en cada experimento.

Ensayos de pull-down. De acuerdo a protocolos reportados previamente (Lane *et al*, 2006), 13 μ g de GST-FliLp, 16 μ g de GST-MotBp u 8 μ g de GST unidas a perlas de agarosa glutatión en PBS pH7.4, fueron mezcladas con FlgT para alcanzar una proporción molar 1:1 de GST-FliLp, GST-MotBp o GST con FlgT-His_{6x}. El volumen total se ajustó a 250 μ l con PBS (pH7.4) y se agregó glicerol a una concentración final de 10%. Las mezclas se incubaron por 2 h a 4°C con agitación constante. Tras la incubación, las perlas se recolectaron mediante centrifugación (1 min a 3,000 rpm) y se removió el sobrenadante cuidadosamente. Se lavaron

las perlas con 1 volumen de PBS (pH 7.4). Finalmente, se agregaron 100 mL de amortiguador de elución (10 mM de L-glutati3n reducido), 100 mM de Tris-HCl pH8) y tras 10 min se centrifugaron las muestras. Se tom3 una al3cuota de 15 mL del sobrenadante y se carg3 en un gel de SDS-PAGE para su an3lisis por Western blot usando anticuerpos α -FlgT. Una muestra de 10 μ L fue usada para su an3lisis con anticuerpos α -GST.

Ensayo de dos h3bridos en levaduras. El sistema de doble h3brido Matchmaker GAL4 (Clontech) se utiliz3 para probar las interacciones entre FlgT-FlgT, FlgT-MotBp, FlgT-FliL, FlgT-MotFp y FlgT-MotF Δ_{77-98} . La regi3n que codifica para el polip3ptido maduro de FlgT se amplific3 por PCR con los oligonucle3tidos 6086DHFV y 6086DHRV. El producto se clon3 en pGBKT7, que codifica el dominio de uni3n a DNA (BD) de GAL4. El pl3smido resultante pGBD-flgT expresa a FlgT fusionada al dominio de uni3n de GAL4. Para amplificar FlgT y clonarlo en el pl3smido pGADT7, que codifica el dominio de activaci3n de GAL4 (AD), se usaron los oligonucle3tidos 6086DHFV y GAD6086RV. El pl3smido resultante pGAD-FlgT expresa a FlgT fusionada al dominio de activaci3n de GAL4. Se fusionaron dos versiones de la regi3n peripl3smica de MotF (MotFp) al AD de GAL4. La primera porta el dominio peripl3smico completo de MotF (MotFp) (residuos 75 a 239). Para obtener este pl3smido, una regi3n de *motF* se amplific3 usando los oligonucle3tidos DH67coilF y RSP_0067GST rvs STOP; el producto de amplificaci3n se clon3 en pGADT7 para obtener el pl3smido pGAD-MotFp. Para la segunda versi3n se amplific3 *motF* con los oligonucle3tidos pG67COOH y RSP_0067-GST Rvs STOP. En este caso, se excluy3 la regi3n que codifica los residuos 77 a 98. Posteriormente el producto de PCR se clon3 en pGADT7 y el pl3smido resultante se nombr3 pGAD-MotF Δ_{77-98} . El pl3smido pGAD-motBp se construy3 amplificando el segmento peripl3smico de MotB mediante los oligonucle3tidos ADBDmotb1 y ADmotB2. El producto obtenido se clon3 en pGADT7. Las interacciones se examinaron introduciendo los pl3smidos que expresan las prote3nas a la cepa reportera AH109. Las dobles transformantes se crecieron

toda la noche en medio mínimo sintético definido (SD) sin leu y trp, pero suplementado con histidina (His) y adenina (Ade). Se lavaron una vez las alícuotas de los cultivos con medio mínimo SD sin suplementos y después de normalizaron a $DO_{600}=0.5$. Inmediatamente se realizaron diluciones seriales de 10 veces en el mismo medio. Para estas diluciones, se sembraron alícuotas de 10 mL en placas de selección sin Trp, Leu e His; o TrP, Leu, His y Ade.

Microscopía. Una muestra de cultivo crecido a fase exponencial se colocó en un portaobjetos con una cama de agarosa con medio mínimo de Sistrom. Las imágenes de epifluorescencia se tomaron usando un microscopio Nikon Eclipse 600 acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-ER. Las imágenes se expusieron 3 segundos.

Microscopía electrónica de transmisión. De un cultivo en fase exponencial, se colectaron las células mediante centrifugación a 3,000 rpm. La pastilla se resuspendió suavemente en un tercio del volumen original de amortiguador TE. Después, una alícuota se colocó en una gradilla cubierta de carbón y se tiñó con ácido fosfotúngstico al 1% (pH7). Las muestras del cuerpo basal-filamente se prepararon mediante un método descrito con anterioridad (ref), y se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 7). Estas preparaciones se observaron con un microscopio electrónico JEM-1200EX (JEOL, Tokio) y las micrografías se tomaron usando una cámara digital Gatan a un voltaje de aceleración de 80 kV.

Tabla 1 Cepas y plásmidos usados en este estudio.

Cepa o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
Cepas		
<i>E. coli</i>		
LMG194	Cepa para expresión de proteínas	Invitrogen
Rosetta	Cepa para expresión de proteínas	Novagen
S17-1	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2 Tc::Mu::Tn7	Simon <i>et al</i> , 1983
TOP10	Cepa para clonar productos de PCR	Invitrogen
 <i>R. sphaeroides</i>		
FS3	Δ <i>fliL3::aadA</i>	Suaste <i>et al</i> , 2010.
SF3	<i>flgT::aadA</i>	Este trabajo
SF4	<i>flgT::aadA</i> Δ <i>motB1::Kan</i>	Este trabajo
SF5	<i>flgT::aadA motB_{sup10}</i>	Este trabajo

SF6	<i>flgT::aadA motB_{sup11}</i>	Este trabajo
SP12	<i>ΔfleT1::aadA</i>	Poggio <i>et al</i> , 2005.
SP13	<i>ΔfleQ1::Kan</i>	Poggio <i>et al</i> , 2005.
WS8	Cepa silvestre	Socket <i>et al</i> , 1990.

S. cerevisiae

AH109	Cepa reportera de levadura, for <i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , and <i>lacZ</i>	Clontech
-------	---	----------

Plásmidos

pBAD/Myc-HisA	Vector de expresión de proteínas con colas de His, Apr ^r	Invitrogen
pGADT7	Dominio de activación GAL4 , <i>LEU2</i>	Clontech
pGBKT7	Dominio de unión GAL4 DNA, <i>TRP1</i>	Clontech
pJQ200mp18	Vector suicida movilizable, Gm ^r	Quandt y Haynes, 1993
pPIRL	Codifica tRNAs para codones poco frecuentes , Cm ^r	Bao, 2001
pRK415	Vector de expresión en <i>R. sphaeroides</i> , Tc ^r	Keen <i>et al</i> 1998
pTZ19R	Vector de clonación, Apr ^r	Pharmacia
pWM5	Derivado de pUC que porta el cassette omega-Spc ^r	Metcalf y Wanner, 1994
pBAD/Myc-HisA-flgT	Vector que expresa FlgT-His ₆ X	Este trabajo
pGBD-flgT	Derivado de pGBD que expresa GAL4 BD-FlgT	Este trabajo
pGAD-flgT	Derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-FlgT	Este trabajo
pGAD-fliLp	Derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-FliLp	Suaste <i>et al</i> , 2010
pGAD-motBp	Derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-MotBp	Este trabajo
pGAD-motFp	Derivado de pGAD que expresa GAL4 AD-MotFp	Este trabajo
pGAD-motFpD ₇₇₋₉₈	Derivado de pGAD que expresa GAL4 AD MotFD ₇₇₋₉₈	Este trabajo
pRK415_flgT	pRK415 que expresa FlgT	Este trabajo

pRK_gfp-flil	pRK415 que expresa la fusión GFP-Flil	Suaste <i>et al</i> , 2010
pRK_gfp-motF	pRK415 que expresa la fusión GFP-MotF	Este trabajo
pRKmotBsup2	pRK415 que expresa <i>motB_{sup2}</i> (MotB A67 E)	Suaste <i>et al</i> , 2010
pRKmotBsup4	pRK415 que expresa <i>motB_{sup4}</i> (MotB F 63 L)	Suaste <i>et al</i> , 2010
pRKmotBsup5	pRK415 que expresa <i>motB_{sup5}</i> (MotB A 76 D)	Suaste <i>et al</i> , 2010
pRKmotBsup6	pRK415 que expresa <i>motB_{sup6}</i> (MotB A 67 T)	Suaste <i>et al</i> , 2010
pRKmotBsup8	pRK415 que expresa <i>motB_{sup8}</i> (MotB A 67 G)	Suaste <i>et al</i> , 2010
pTZ_FlgT	<i>flgT</i> clonado en pTZ19R BamHI-	Este trabajo
pTZ19R Bam-	Derivado de pTZ19R sin sitio BamHI	Colección del laboratorio

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

RSP0035C	5' CGGAATTCCCGAGGCGGCCAGAGGCGCG 3'
ORF12	5' GCTCTAGACG TTCAGCGCCTCCACATGG 3
pRK/ 6086 F	5' CGTCTAGAGTCACGCCGAAGGGCAGCGAC 3'
pRK6086 R	5' GCGAATTCCG TTCAGCGCCTCCACATGG 3'
pBADmyc6086SPS-fw	5' TAGAATTGACAGCCCCGCCGTC 3'
pBADmyc6086SPS-rv	5' ATAAGCTTCCGGCCGGTCTCCA 3'
6086DHFw	5' CGGAATTGCGCGTCCGGGTCGAGGCCGA 3'
6086DHRv	5' CGCTGCAGGCCGGCCGGTCTCCACGAACTGC 3'
GAD6086Rv	5' ATCCCGGGGCCGGCCGGTCTCCACGA 3'
DH67CoilF	5' GAATTCCGCTCGGTCGCCGATCTGCGCGA 3'
pG67FCOOH	5' GAATTCACCGAGCTCGGCGAGGCCATCG 3'
RSP0067-GSTRvsSTOP	5' CCCGGGTCACGGATAACGGATCGGATTG 3'
ADBDmotB1	5' GCGAATTCTCG TTCAGCAAGATGGCGGGG 3'
ADmotB2	5' GCGAGCTCTCAGTCCTTGTAGGAAATCTC 3'
pIND 6086 completo FW	5' TCAGATCTGTGAGACGGCTTCTCCTCCT 3'
6086/pIND RW	5' CCAGATCTTACCGGCCGGTCTCCACG 3'

dorAF1 Eco Ri 5' CAGAATTCGACGAAGCCCGGCAAGACCGTC 3'

dorAR1 ApeI 5' CAGAATTTGAGACCGAGAGCCCCACAGC 3'

cfpF1 ApeI 5' CAAAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC 3'

cfpR1 SacI 5' CAGAGCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTG 3'

BIBLIOGRAFÍA

- Armitage JP, Macnab RM.** 1987 Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **169**: 514-518.
- Aizawa SI, Dean GE, Jones CJ, Macnab RM, Yamaguchi S.** 1985 Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **161**: 836-849.
- Asai Y, Kojima S, Kato H, Nishioka N, Kawagishi I, Homma M.** 1997. Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marina bacterium. J. Bacteriol. **179** (16) 5104-5110.
- Attmannspacher U, Scharf BE, Harshey RM.** 2008 FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. **68**: 328-341.
- Bao K, Cohen SN.** 2001 Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. Genes Dev. **15**: 1518-1527.
- Belas, R., E. Horikawa, S. Aizawa, and R. Suvanasuthi.** 2009. Genetic determinants of *Silicibacter sp.* TM1040 motility. J. Bacteriol. **191**:4502–4512.
- Belas, R., and R. Suvanasuthi.** 2005. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. J. Bacteriol. **187**:6789–6803.
- Berg HC.** 2003 The rotary motor of bacterial flagella. Annu. Rev. Biochem. **72**: 19-54.

- Blair DF, Berg HC.** 1988 Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* **242**: 1678-1681.
- Blair DF, Berg HC.** 1990 The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**: 439-449.
- Blair DF, Berg HC.** 1991 Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J. Mol. Biol.* **221**: 1433-1442.
- Blair DF.** 2003 Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* **545**: 86-95.
- Braun TF, Blair DF.** 2001 Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H(+) channels in the stator complex. *Biochemistry* **40**:13051-13059.
- Braun TF, Al-Mawsawi LQ, Kojima S, Blair DF.** 2004 Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**: 35-45
- Brown PN, Terrazas M, Paul K, Blair DF.** 2007. Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implication for organization of the switch complex. *J Bacteriol* 189 (2) 305-312.
- Brown MT, Delalez NJ, Armitage JP.** 2011. Protein dynamics and mechanisms controlling the rotational behaviour of the bacterial flagellar motor. *Curr. Opin. Microbiol.* 14 (6) 734-740.
- Cameron DE, Urbach JM, Mekalanos JJ.** 2008 A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 8736-8741.
- Cascales E, Gavioli M, Sturgis JN, Lloubès R.** 2001. Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 38 (4) 904-915.

- Che YS, Nakamura S, Kojima S, Kami-ike N, Namba K, Minamino T.** 2008
Suppressor analysis of the MotB(D33E) mutation to probe bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation. *J. Bacteriol.* **190**: 6660-6667.
- Chun SY, Parkinson JS.** 1988 Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278.
- Davis J, Donohue TJ, Kaplan S.** 1988 Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **170**: 320-329.
- Dean GE, Macnab RM, Stader J, Matsumura P, Burks C.** 1984 Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 991-999.
- De Mot R, Schoofs G, Nagy I, Vanderleyden J.** 1994. Sequence of the *cobA* gene encoding S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase of *Pseudomonas fluorescens*. 1994. *Gene*. 2; 150 (1) 199-200.
- Dibrov PA, Kostyko VA, Lazarova RL, Skulachev VP, Smirnova IA.** 1986 The sodium cycle. I. Na⁺-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **850**: 449-457.
- Erhardt M, Namba, T, Hughes KT.** 2010 Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* Nov (2) 11.
- Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ.** 1994 Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**: 1261-1270.
- Harlow E, Lane D.** (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hizukuri Y, Morton JF, Yakushi T, Kojima S, Homma M.** 2009 The peptidoglycan-binding

(PGB) domain of the *Escherichia coli* Pal protein can also function as the PGB domain in *E. coli* flagellar motor protein MotB. J. Biochem. **146**:219-229.

Hizukuri Y, Kojima S, Homma M. 2010 Disulphide cross-linking between the stator and the bearing components in the bacterial flagellar motor. J. Biochem. **148**: 309-318.

Hosking ER, Vogt C, Bakker EP, Manson MD. 2006 The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. J. Mol. Biol. **364**: 921-937. **Jarrell, KF, McBride MJ.** 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. Nature Revs. Microbiol. 6: 466-475

Jenal, U., J. White, and L. Shapiro. 1994. *Caulobacter* flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. J. Mol. Biol. **243**:227–244.

Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988 Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. Gene **70**: 191-197.

Kihara M, Miller GU, Macnab RM. 2000. Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of Salmonella. J Bacteriol. 182 (11) 3022-3028.

Kim EA, Price-Carter M, Carlquist WC, Blair DF. 2008 Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change. Biochemistry **47**: 11332-11339.

Kobayashi K, Saitoh T, Shah DS, Ohnishi K, Goodfellow IG, Sockett RE, Aizawa SI. 2003 Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **185**: 5295-5300.

Kojima S, Blair DF. 2004 The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. Int. Rev. Cytol. **233**: 93-134.

Kojima S, Imada K, Sakuma M, Sudo Y, Kojima C, Minamino T, Homma M, Namba K. 2009 Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. Mol. Microbiol. **73**: 710-718.

- Kojima S, Nonoyama N, Takekawa N, Fukuoka H, Homma M.** 2011 Mutations targeting the C-terminal domain of FliG can disrupt motor assembly in the Na(+)-driven flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.* **414**: 62-74.
- Kojima S, Blair DF.** 2001 Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* **40**: 13041-13050.
- Laemmli UK.** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lane MC, O'Toole PW, Moore SA.** 2006 Molecular basis of the interaction between the flagellar export proteins FliI and FliH from *Helicobacter pylori*. *J. Biol.Chem.* **281**: 508-517.
- Leake MC, Chandler JH, Wadhams GH, Bai F, Berry RM, Armitage JP.** 2006 Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**: 355-358.
- Lee LK, Ginsburg MA, Crovace C, Donohoe M, Stock D.** 2010 Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. *Nature* **466**: 996-1000.
- Li N, Kojima S, Homma M.** 2011 Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. *Genes Cells* **16**: 985-999.
- Lloyd SA, Blair DF.** 1997 Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **266**: 733-744.
- Macnab RM.** 2003 How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 77-100.
- Martinez-del Campo A, Ballado T, Camarena L, Dreyfus G.** 2011 In *Rhodobacter sphaeroides*, chemotactic operon 1 regulates rotation of the flagellar system 2. *J. Bacteriol.* **193**: 6781-6786.
- Martinez RM, Dharmasena MN, Kirn TJ, Taylor RK.** 2009 Characterization of two outer membrane proteins, FlgO and FlgP, that influence *Vibrio cholerae* motility. *J. Bacteriol.* **191**: 5669-5679.
- Martinez RM, Jude BA, Kirn TJ, Skorupski K, Taylor RK.** 2010 Role of FlgT in anchoring the

flagellum of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **192**: 2085-2092.

McCarter LL. 1994. (a) MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. J Bacteriol. 176 (19) 5988-5998

McCarter LL. 1994. (b) MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. J. Bacteriol. 176 (14) 4219-4225.

Metcalf WW, Wanner BL. 1993 Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. Gene **129**: 17-25.

Minamino T, Imada K, Namba K. 2008 Molecular motors of the bacterial flagella. Curr. Opin. Struct. Biol. **18**: 693-701.

Morimoto YV, Che YS, Minamino T, Namba K. 2010 Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. FEBS Lett. **584**: 1268-1272.

Morimoto YV, Nakamura S, Hiraoka KD, Namba K, Minamino T. 2013 Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. J. Bacteriol. **195**: 474-481.

Nambu T, Kutsukake K. 2000. The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. Microbiol. 146 (pt. 5) 1171-1178.

Norihiro T, Kojima S, Homma M. 2013. Fluorescence imaging of GFP-fused periplasmic components of Na⁺- driven flagellar motor using Tat pathway in *Vibrio alginolyticus*. J Biochem. 153 (6) 547-53.

O'Neill J, Xie M, Hijnen M, Roujeinikova A. 2011 Role of the MotB linker in the assembly and activation of the bacterial flagellar motor. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **67**: 1009-1016.

Okabe M, Yakushi T, Homma M. 2005 Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum.

J. Biol. Chem. **280**: 25659-25664.

Packer HL, Harrison DM, Dixon RM, Armitage JP. 1994. The effect of pH on the growth and motility of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and the nature of the driving force of the flagellar motor. Biochim Biophys Acta. 1188 (1-2) 101-107.

Paul K, Gonzalez-Bonet G, Bilwes AM, Crane BR, Blair D. 2011 Architecture of the flagellar rotor. EMBO J. **30**: 2962-2971.

Paulick A, Koerdt A, Lassak J, Huntley S, Wilms I, Narberhaus F, Thormann

KM. 2009 Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. Mol. Microbiol. **71**: 836-850.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011 SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods **8**: 785-786.

Poggio S, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **189**: 3208-3216.

Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2005 The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. Mol. Microbiol. **58**: 969-983.

Quandt J, Hynes MF. 1993 Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. Gene **127**: 15-21.

Raha, M., H. Sockett, and R. M. Macnab. 1994. Characterization of the *fliL* gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **176**:2308–2311.

- Ramirez-Cabrera V, Poggio S, Domenzain C, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L.** 2012 A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. *J. Bacteriol.* **194**: 6174-6183.
- Reid SW, Leake MC, Chandler JH, Lo CJ, Armitage JP, Berry RM.** 2006 The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 8066-8071.
- Roujeinikova A.** 2008 Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: implications for peptidoglycan recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 10348-10353.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y.** 2010 I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**: 725-738.
- Roy A, Yang J, Zhang Y.** 2012 COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res.* **40**: W471-477.
- Schoenhals, G. J., and R. M. Macnab.** 1999. Flil is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology* **145**:1769– 1775.
- Sistrom WR.** 1962 The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **28**: 607-616.
- Simon R, Priefer, U, Phuler A.** 1983 A broad host range mobilization system for *in vivo* genetics engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnol* **1**: 784-791.
- Sowa Y, Berry RM.** 2008 Bacterial flagellar motor. *Q. Rev. Biophys.* **41**: 103-132.
- Sockett RE, Foster, JCA, Armitage J. P.** 1990 Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp.* **53**: 473-479.
- Sommerlad SM, Hendrixson DR.** 2007 Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **189**: 179-186.

Stolz B, Berg HC. 1991 Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **173**: 7033-7037.

Suaste-Olmos F, Domenzain C, Mireles-Rodriguez JC, Poggio S, Osorio A, Dreyfus G, Camarena L. 2010 The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. **192**: 6230-6239.

Suzuki H, Yonekura K, Namba K. 2004 .Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. J Mol Bio. 12;337 (1) 105-113.

Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, Satchell KJ, Yildiz F, Klose KE. 2009. The *Vibrio cholera* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. J. Bacteriol. 191. 65555-6570.

Tang H, Braun TF, Blair DF. 1996 Motility protein complexes in the bacterial flagellar motor. J. Mol. Biol. **261**: 209-221.

Terashima H, Fukuoka H, Yakushi T, Kojima S, Homma M. 2006 The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. Mol. Microbiol. **62**: 1170-1180.

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

Terashima H, Koike M, Kojima S, Homma M. 2010 The flagellar basal body- associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. J. Bacteriol. **192**: 5609-5615.

Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M, Imada K. 2013 Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **110**: 6133-6138.

- Thomas DR, Morgan DG, DeRosier DJ.** 1999. Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. PNAS 96 10134-10139.
- Thomas JD, Daniel RA, Errington J, Robinson C.** 2001. Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 39 (1) 47-53.
- Van Way SM, Hosking ER, Braun TF, Manson MD.** 2000 Mot protein assembly into the bacterial flagellum: a model based on mutational analysis of the *motB* gene. J. Mol. Biol. **297**: 7-24.
- West MA, Dreyfus G.** 1997 Isolation and ultrastructural study of the flagellar basal body complex from *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (wild type) and a polyhook mutant PG. Biochem. Biophys Res. Commun. **238**: 733-737.
- Wilson ML, Macnab RM.** 1990 Co-overproduction and localization of the *Escherichia coli* motility proteins motA and motB. J. Bacteriol. **172**: 3932-3939.
- Yamaguchi S, Aizawa S, Kihara M, Isomura M, Jones CJ, Macnab RM.** 1986 Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **168**: 1172-1179.
- Yorimitsu T, Homma M.** 2001 Na(+)-driven flagellar motor of *Vibrio*. Biochim. Biophys. Acta **1505**: 82-93.
- Zhang Y.** 2008 I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics **9**: 40.
- Zhao R, Amsler CD, Matsumura P, Khan S.** 1996 FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. J. Bacteriol. **178**: 258-265.
- Zhou J, Fazio RT, Blair DF.** 1995 Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **251**: 237-242.

Zhou J, Blair DF. 1997 Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* **273**: 428-439.

Zhou J, Sharp LL, Tang HL, Lloyd SA, Billings S, Braun TF, DF. 1998 Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J. Bacteriol.* **180**: 2729-2735.

Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. 1998 Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6436-6441.

