



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del marco de lectura abierto  
RSWS8N\_12065 del sistema flagelar 2 de *Rhodobacter  
sphaeroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Arely Ivonne Marcos Vilchis

Dr. Georges Dreyfus Cortés  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco (Facultad de Medicina, UNAM)  
Dra. Bertha González Pedrajo (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Ciudad de México. Octubre, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Georges Dreyfus por permitirme integrarme a su laboratorio y poder enriquecer mi formación. También le agradezco a la Dra. Laura Camarena por su apoyo para la realización de este proyecto.

A la QFB Teresa Ballado y al Dr. Javier de la Mora, por su infinita asesoría en este proyecto.

Al comité tutorial, integrado por el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y la Dra. Bertha González Pedrajo por la evaluación y sugerencias para el desarrollo del proyecto, así como mi formación académica.

A los miembros del jurado de revisión de tesis conformado por el Dr. Rodolfo García Contreras, el Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, la Dra. Irma Romero Álvarez y la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía. Sus comentarios y observaciones permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. Clelia Domenzain por su ayuda con el uso del microscopio de epifluorescencia en el laboratorio de la Dra. Camarena.

Al Bioterio y las Unidades de Imagenología y Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por los servicios prestados.

El presente trabajo fue financiado por los donativos de DGAPA/PAPIIT (IN204317) y CONACyT (CB235996).

El apoyo del PAEP 2016 y 2017 se utilizó para la asistencia al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica y el BLAST XIV.

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría (No. de becario 584136).

## **Dedicatoria**

Una persona es la suma de todas sus experiencias, es por ello que me gustaría dedicarle unas palabras a todas aquellas personas que han sido muy importantes para mí.

Le agradezco profundamente a mi mamá y mis hermanos, personas muy queridas que sin duda me han apoyado a lo largo de toda mi vida. Gracias a su constante esfuerzo he logrado llegar hasta este punto.

Mis dos compañeros peluditos, Zelda y Hamtaro. Ambos me hicieron pasar momentos muy gratos, su compañía siempre ha representado uno de los momentos más alegres de cada día.

Jen, Jorge y Yetza. Ustedes son mis grandes amigos de la carrera y por supuesto, de mi vida. Les agradezco el apoyo incondicional que me han otorgado, así como sus sabios consejos que me han permitido crecer como persona.

Tere Ballado, también me gustaría agradecerte. En estos años que he convivido contigo has sido de mucha ayuda, tanto en aspectos académicos como personales. Sin lugar a dudas, eres la persona más paciente, amable y considerada que conozco. Enriqueces mi día a día.

Kathia! Nos conocimos en el posgrado y te agradezco mucho los pequeños momentos de tú tiempo que me has otorgado. Eres una mujer muy inteligente y capaz, eres un gran ejemplo a seguir.

Mariela, debo decir que a pesar de ser tan diferentes, hemos cultivado una amistad que crece todos los días. Te agradezco por escucharme siempre que lo he necesitado.

Y por supuesto a Félix. Nos conocimos por casualidad y jamás pensé que en algún punto fuéramos a ser tan grandes amigos. Te agradezco mucho todos los momentos que me has otorgado, todas las enseñanzas que me has proporcionado y todo tu apoyo. Eres una persona que ha cambiado significativamente mi vida, eres sumamente valioso para mí. Me faltan palabras para agradecerte por todo.

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>1</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>Motilidad en bacterias</b> .....	8
<b>El flagelo bacteriano</b> .....	9
<u>Filamento</u> .....	10
<u>Gancho</u> .....	12
<u>Cuerpo basal</u> .....	14
<b>Torque</b> .....	21
<b>Jerarquía transcripcional y biogénesis flagelar</b> .....	23
<b>Diversidad de estructuras en el flagelo</b> .....	28
<b>Quimiotaxis</b> .....	29
<b>Antecedentes</b> .....	<b>33</b>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> .....	33
<b>Objetivo general</b> .....	<b>39</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>39</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>40</b>
<b>Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo</b> .....	40
<b>Reacción en cadena de la polimerasa o <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)</b> .....	41
<b>Digestiones con enzimas de restricción</b> .....	42
<b>Reacción de ligación</b> .....	42
<b>Purificación de plásmido</b> .....	43
<b>Clonación de <i>motK</i> y <i>motB2</i> para sobreexpresión</b> .....	43
<b>Aislamiento de las mutantes en <i>motK</i>, <i>motB2</i>, <i>motA2</i> y <i>fliL2</i></b> .....	43
<b>Complementación de las cepas mutantes</b> .....	44
<b>Ensayos de nado en placas de agar suave</b> .....	44
<b>Conjugación biparental</b> .....	44
<b>Competencia y transformación en <i>E. coli</i></b> .....	45
<b>Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante</b> .....	45
<u>MotK recombinante soluble</u> .....	45
<u>MotK recombinante en condiciones desnaturalizantes</u> .....	46
<u>MotB2p recombinante</u> .....	46
<b>Generación de anticuerpos policlonales contra MotK</b> .....	47
<b>Ensayo de interacción proteína-proteína: Coimmunoprecipitación</b> .....	47
<b>Localización de MotK</b> .....	48
<b>Inmunodetección de MotK</b> .....	49
<b>Aislamiento de filamento-gancho-cuerpo basal</b> .....	49
<b>Rasurado del filamento de las células (<i>Shearing</i>)</b> .....	50
<b>Resultados</b> .....	<b>51</b>
<b>Análisis bioinformático de la secuencia RSWS8N_12065</b> .....	51
<b>Mutante en RSWS8N_12065</b> .....	54
<b>Purificación de MotK recombinante en condiciones desnaturalizantes</b> .....	56
<b>Inmunodetección de MotK</b> .....	57

<b>Localización de MotK-sfGFP .....</b>	<b>58</b>
<b>Purificación de MotK recombinante soluble .....</b>	<b>63</b>
<b>Purificación de MotB2p recombinante .....</b>	<b>64</b>
<b>Ensayo de interacción de proteína-proteína: coimmunoprecipitación .....</b>	<b>65</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>73</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>75</b>

## Lista de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Amp:	Ampicilina
ATP:	Adenosín trifostato
ARN <sub>t</sub> :	Ácido ribonucleico de transferencia
BLAST:	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales (del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
CCW:	En dirección contraria a las manecillas del reloj (del inglés, <i>Counter ClockWise</i> )
Cm:	Cloranfenicol
CP:	Capa de peptidoglicano
CW:	En dirección a las manecillas del reloj (del inglés, <i>ClockWise</i> )
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Ácido etilendiaminotetra acético (del inglés, <i>Ethylenediaminetetra acetic acid</i> )
FT:	La fracción no unida (del inglés, <i>Flow Through</i> )
GCB:	Gancho-cuerpo basal
Gm:	Gentamicina
GTA:	Agente de transferencia (del inglés, <i>Gene Transfer Agent</i> )
HAP:	Proteína asociada al gancho (del inglés, <i>Hook-associated protein</i> )
Hgo:	Higromicina
Hz:	Hertz
IMG:	Genomas microbianos integrados (del inglés, <i>Integrated Microbial Genomes</i> )
Kan:	Kanamicina
kDa:	KiloDaltons
kpb:	Kilo pares de bases
LB:	Luria Broth
Lv:	Lavado sin imidazol
MCP:	Proteínas quimiotácticas aceptoras de metilo (del inglés, <i>Methyl-accepting Chemotaxis Proteins</i> )
mM:	milimolar
Mpb:	Mega pares de bases
ME:	Membrana externa
MI:	Membrana interna
Nal:	Ácido nalidíxico
Ni-NTA:	Níquel ácido nitrilo triacético (del inglés, <i>Nickel-Nitrilo Triacetic Acid</i> )
pb:	Pares de bases
PBP:	Proteína de unión periplásmica (del inglés, <i>Periplasmic Binding Protein</i> )
PBS:	Amortiguador fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase chain reaction (PCR)</i> )
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, <i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i> )
REC:	Dominio receptor (del inglés, <i>RECeiver</i> ).
rpm:	Revoluciones por minuto
Sec:	Sistema de secreción general
SDS:	Dodecil sulfato sódico (del inglés, <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
Spc:	Espectinomicina
sfGFP:	Superfolder proteína verde fluorescente (del inglés, <i>superfolder Green Fluorescent Protein</i> )
-Sux:	Medio Sistro sin ácido succínico ni casaminoácidos
TCA:	Ácido tricloroacético (del inglés, <i>Trichloroacetic acid</i> )
μM:	Micromolar
TPR:	motivos repetidos de tetratricopéptidos (del inglés, <i>Tetra Tricopeptide Repeat</i> )
Tc:	Tetraciclina

## Resumen

Las bacterias utilizan diferentes mecanismos para desplazarse ya sea en medio líquido o en sólido. En el caso del nado en medio líquido, se lleva a cabo mediante el flagelo, éste se encuentra compuesto de diferentes anillos así como estructuras axiales. Al ser un motor, posee un rotor y un estator, este último se compone de los elementos generadores del torque que utilizan la energía de iones específicos para convertirla en trabajo mecánico, de esta forma permiten que el flagelo rote y funcione como propulsor para la célula.

La  $\alpha$ -proteobacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* posee dos sistemas flagelares, *fla1* y *fla2*. Se ha demostrado que *fla1* se adquirió por transferencia horizontal de una  $\gamma$ -proteobacteria ancestral, mientras que *fla2* es el sistema flagelar de herencia vertical. En el *locus* de *fla2*, se encuentran varios marcos de lectura abiertos de función desconocida. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la participación del marco de lectura abierto RSWS8N\_12065, que en este trabajo se llamó *motK*. Como primer paso se evaluó el fenotipo de la mutante en este marco de lectura abierto, el cual fue Mot<sup>-</sup>; es decir, la bacteria tiene flagelos pero no es mótil.

Una búsqueda bioinformática mostró que el contexto genético en el que *motK* se encuentra, está conservado en la familia *Rhodobacteraceae*. Interesantemente, forma parte de un operón con otros componentes asociados al motor. La fusión MotK-sfGFP se localiza en el polo de la célula. Esta localización se probó en fondos genéticos carentes de algunas proteínas del motor y se encontró que es dependiente de FliL2 y MotB2 pero no de MotA2.

Además, análisis bioinformáticos indicaron que la proteína posee una secuencia señal de exportación para la vía Sec, posiblemente su localización sea periplásmica. Así que, considerando el fenotipo y la posible localización de la proteína, se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación con MotB2, que es un componente del estator de Fla2; y el resultado fue positivo, lo que indica que estas dos proteínas interactúan.

Los resultados en conjunto sugieren que MotK es un nuevo componente asociado al motor de Fla2 de *R. sphaeroides*.

## Abstract

Bacteria possess different mechanisms to move on liquid media or solid surfaces. In the case of swimming in liquid media, it is carried out by means of the flagellum, which is composed by several rings as well as axial structures. By being a motor it possesses a rotor and a stator, the latter is composed by torque generating elements that use the energy from specific ions to convert it in mechanical work, this way, the flagellum can rotate and function as a propeller for the cell.

The photosynthetic  $\alpha$ -proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* possess two flagellar systems, *fla1* and *fla2*. It has been shown that *fla1* was acquired by horizontal transfer from an ancestral  $\gamma$ -proteobacterium, while *fla2* is the flagellar system of vertical inheritance. In the *fla2* locus, there are some open reading frames of unknown function. The objective of this work was to study the role of the open reading frame RSWS8N\_12065, which was named *motK*. As a first approach, we evaluated the phenotype of the mutant in this open reading frame, which is Mot<sup>-</sup>; that is, the bacterium has flagella but is non-motile.

A bioinformatic search showed that the genetic context in which *motK* is located, is conserved among the *Rhodobacteraceae* family. Interestingly, it is part of an operon with other motor associated components. The fusion MotK-sfGFP localizes at cell pole. This location was tested in genetic backgrounds lacking some motor proteins and we found that it is dependent on FliL2 and MotB2 but not on MotA2.

In addition, bioinformatic analyzes indicated that the protein possesses a signal sequence for the Sec pathway, possibly its location is periplasmic. Thus, taking in account the phenotype and possible location of the protein, a coimmunoprecipitation assay was carried out with MotB, which is a Fla2 stator component. The result was positive, indicating that these two proteins interact.

The results suggest that MotK is a new component associated to the Fla2 motor of *R. sphaeroides*.

## Introducción

### Motilidad en bacterias

Las bacterias son microorganismos que han adquirido la capacidad de desplazarse en el medio en el que se encuentren. Existen diferentes mecanismos de motilidad, algunos permiten el desplazamiento en superficies sólidas o semi-sólidas como son:

El movimiento por el cual las bacterias se resbalan sobre las superficies sólidas (del inglés, *sliding*), es una forma pasiva de movimiento que no utiliza estructuras extracelulares tales como *pili*, fimbria o flagelo. Este tipo de desplazamiento se lleva a cabo mediante la secreción de surfactantes, los cuales permiten a las bacterias desplazarse fuera del centro de la colonia (Martínez, *et al.* 1999; Harshey, 2003).

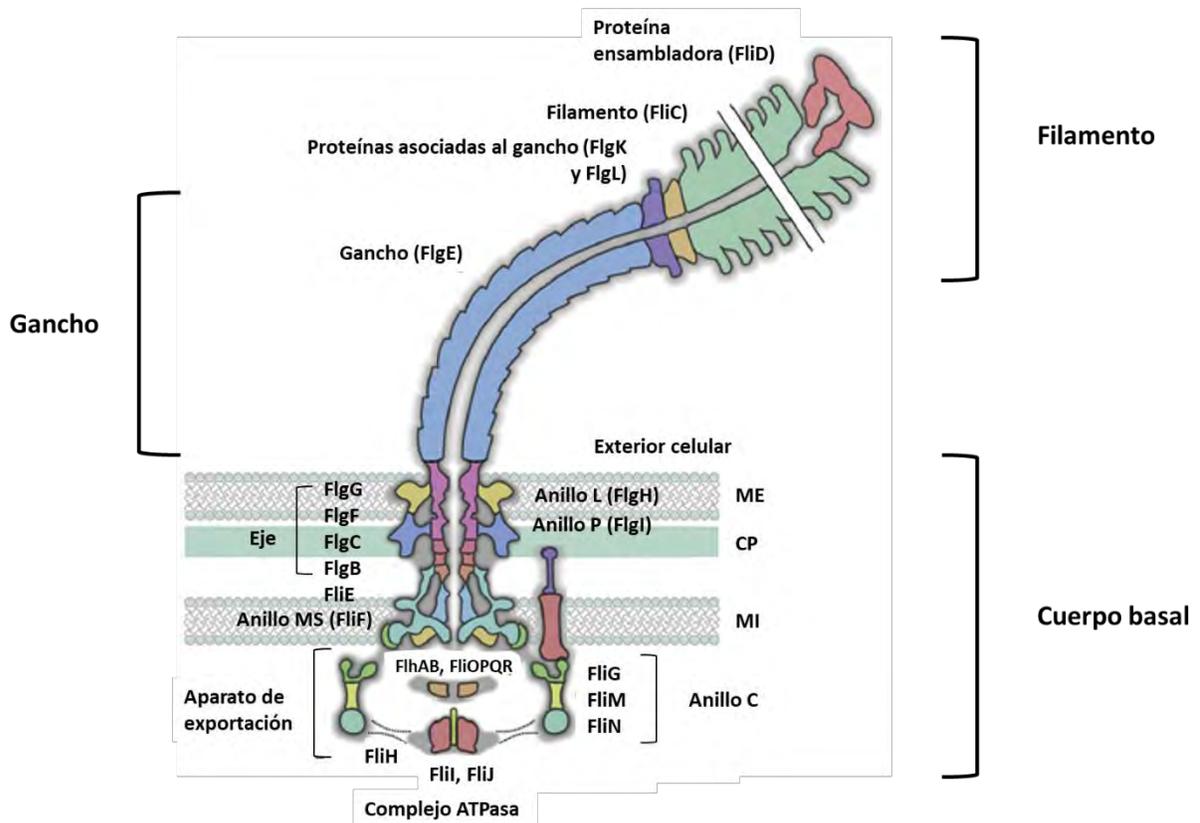
Otro tipo de locomoción en el cual las bacterias se deslizan (del inglés, *gliding*), se encuentra en mixobacterias, flavobacterias y micoplasmas, que no depende de apéndices extracelulares. Para la función de este tipo de locomoción se utilizan diferentes estructuras, los cuales incluyen complejos adhesión-focales, adhesinas de superficie o pequeñas “piernas” proteicas. Se han sugerido diferentes modelos para explicar este tipo de motilidad en las diferentes bacterias que lo presentan. Además, se conoce que la fuerza protón motriz provee de la energía requerida para el desplazamiento, a excepción de los micoplasmas, que utilizan ATP (Nan y Zusman, 2016).

El desplazamiento pulsante (del inglés, *twitching*) es generado por la extensión y retracción del *pili* tipo IV. Una vez que éste se adhiere a una superficie, la fuerza generada por los eventos de retracción y extensión, generada por la energía del ATP, son usados para el desplazamiento (Maier y Wong, 2015).

El movimiento en enjambre (del inglés, *swarming*), es un movimiento grupal impulsado por el flagelo (Fraser y Hughes, 1999). Se encuentra reportado en algunos miembros de las clases  $\alpha$ -proteobacteria y  $\gamma$ -proteobacteria, así como en los firmicutes. En este tipo de motilidad las células se elongan y pueden ser hiperflageladas, estos flagelos son codificados por un sistema flagelar distinto al usado para el nado en medio líquido o en caso contrario, la expresión de un motor alterno (Kearns, 2010; Belas, 2014). Para la inducción

del estado de enjambre (*swarming*), las células requieren de mecanismos de detección de la superficie y éstos involucran al flagelo (Harshey y Partridge, 2015).

Otro mecanismo ampliamente distribuido en las bacterias, es la motilidad en medios líquidos, mejor conocido como nado en medio líquido (del inglés, *swimming*) y en el que participa el flagelo (Fig. 1).



**Figura 1.** Flagelo bacteriano. La estructura del flagelo emerge desde el interior de la célula hacia el exterior. Se muestran las estructuras comunes a los flagelos de diferentes bacterias Gram negativas. Cabe señalar que hay proteínas que participan en la biogénesis de esta estructura y no forman parte de la estructura final, como son: FliK, FlgD y FlgJ. ME: membrana externa; CP: capa de peptidoglicano y MI: membrana interna (Modificado de Evans *et al.*, 2014).

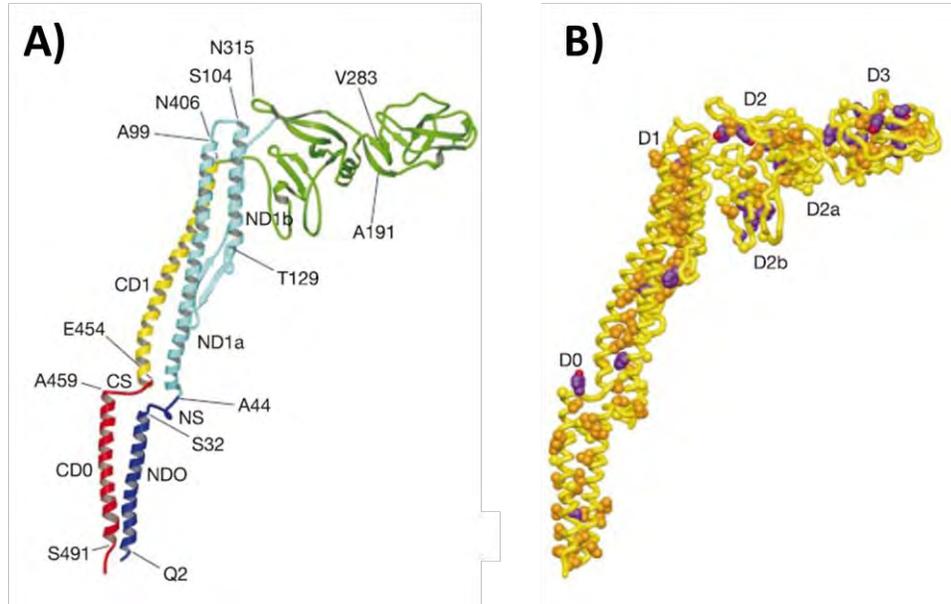
## El flagelo bacteriano

El flagelo es un complejo supramolecular compuesto por diversas proteínas. Se puede dividir en tres partes: el cuerpo basal, el cual se encuentra embebido en la célula; y dos estructuras extracelulares, el gancho y el filamento (Fig. 1).

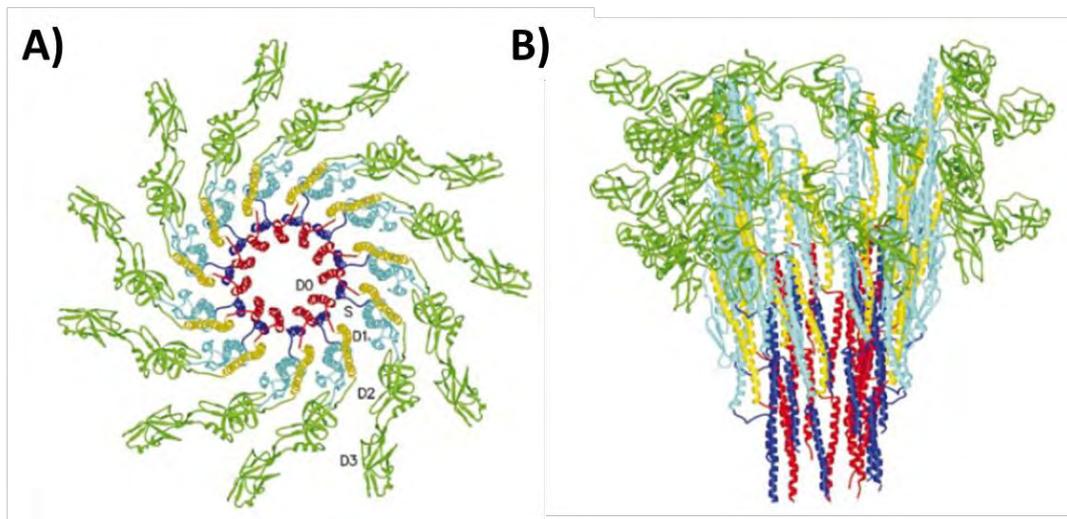
## Filamento

Es la parte más larga del flagelo y puede llegar a medir de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud. El filamento está compuesto por miles de subunidades de una proteína llamada flagelina que forma una estructura tubular que consiste en 11 protofilamentos (O'Brien y Bennet, 1972) a excepción de *Campylobacter jejuni* que tiene 7 protofilamentos (Galkin *et al.*, 2008). La biogénesis del filamento comienza desde la parte más distal, durante este proceso, en la punta del complejo FlgK-FlgL (complejo también conocido como HAP3-HAP1, por sus siglas en inglés *Hook-associated protein*), se forma un pentámero de la proteína FliD o HAP2 que promueve la polimerización de los monómeros del filamento (Yonekura *et al.*, 2000).

El filamento de *Salmonella enterica* posee un diámetro de 24 nm y se conforma por una única proteína llamada flagelina o FliC. Debido a que la proteína completa tiende a polimerizar en filamentos y previene la cristalización, el fragmento F41 de FliC, que carece de los extremos amino y carboxilo, se utilizó para determinar la estructura cristalográfica por difracción de rayos X (Samatey *et al.*, 2001). Posteriormente mediante criomicroscopía electrónica, se utilizó el fragmento F41 para determinar la estructura del filamento a nivel atómico (Yonekura *et al.*, 2003). FliC posee cuatro dominios denominados D0, D1, D2 y D3 (Fig. 2). Los dominios D0 y D1 forman una doble estructura tubular concéntrica en el centro del filamento, con un canal central de 2 nm de diámetro, mientras que los dominios D2 y D3 se extienden hacia afuera (Fig. 3A). La interacción de las subunidades de forma axial y lateral, ocurre mediante los dominios D0 y D1 (Fig. 3B). En la parte tubular interna, los residuos hidrofóbicos estabilizan las interacciones, mientras que, en la parte tubular externa, las interacciones intersubunidades son polar-polar o polar-carga (Yonekura *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Estructura de la flagelina (FliC). A) Modelo de listones que muestra las estructuras secundarias de FliC. B) Modelo que muestra la distribución hidrofóbica de la proteína; amarillo: Ala y Met; anaranjado: Leu, Ile y Val; morado y rojo: Phe, Tyr y Pro (Tomado de Yonekura *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Estructura del filamento. A) Vista superior, en la que se muestra el arreglo de los dominios de la flagelina en la estructura del filamento. B) Vista desde la parte externa del filamento (Tomado de Yonekura *et al.*, 2003).

Los filamentos rotan en dirección contraria a las manecillas del reloj o CCW (del inglés, *Counter ClockWise*) y se forma un haz que sirve como propulsor para la célula, pero cuando el motor cambia de dirección en sentido de las manecillas del reloj o CW (del inglés,

*ClockWise*) el haz se deshace y la célula puede reorientarse (Macnab y Ornston, 1977). Durante estos cambios, el filamento puede adoptar distintas conformaciones, a este fenómeno se le conoce como polimorfismo. Se han descrito 2 tipos, la conformación tipo L (*Left*) y tipo R (*Right*), que se caracterizan por su simetría helicoidal (Asakura, 1970). Un filamento normal tiene principalmente una conformación tipo L con 9L/2R protofilamentos (Hasegawa *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 1998), la transición de L a R ocurre por el cambio en la rotación del motor y genera que al menos uno de los filamentos del haz de filamentos se desestabilice y por lo tanto cambie la dirección de nado (Darnton *et al.*, 2007). Se sabe que los cambios conformacionales en el dominio D1 en la conformación tipo L permite el cambio a la conformación tipo R (Maki-Yonekura *et al.*, 2010).

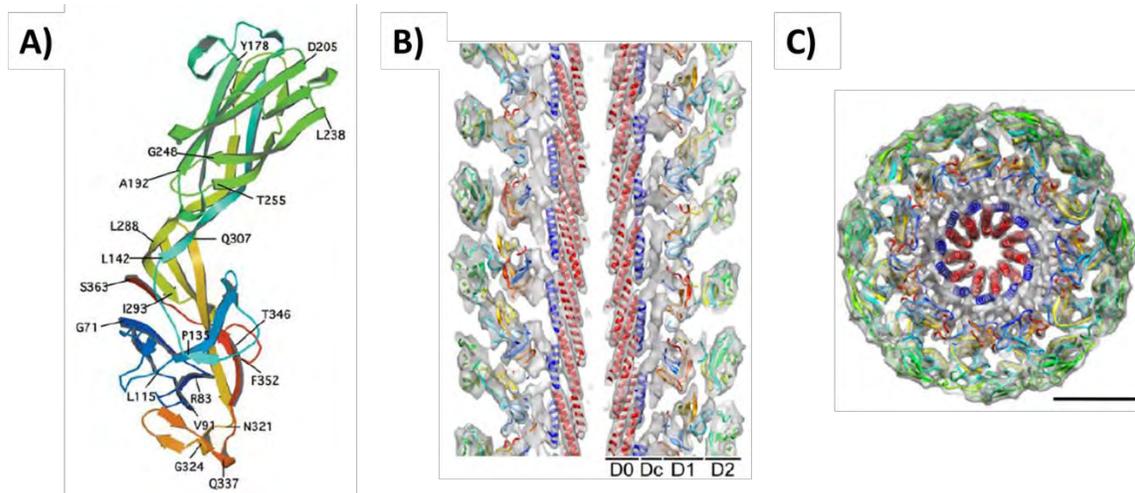
### Gancho

El gancho está compuesto por una única proteína llamada FlgE. Esta estructura se une a la base del filamento mediante las proteínas HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) que sirven como proteínas adaptadoras entre el filamento y el gancho (Ikeda *et al.*, 1987), ya que ambas estructuras poseen diferentes propiedades mecánicas (Fahrner *et al.*, 1994). Además, conecta con el cuerpo basal a través del eje (Kubori *et al.*, 1992). El gancho de *S. enterica* tiene una longitud de  $55 \pm 6$  nm (Hirano *et al.*, 1994), la cual es regulada por una regla molecular conocida como FliK. Una regla molecular consiste en una molécula que mide el tamaño final de una estructura creciente, en este caso, FliK determina la longitud de gancho ya que es secretada continuamente y conforme el gancho adquiere la longitud fisiológica, la velocidad de secreción de FliK disminuye y permite el cambio en la secreción de sustratos (Ver sección Jerarquía transcripcional y biogénesis flagelar) (Erhardt *et al.*, 2010; Erhardt *et al.*, 2011).

La estructura del gancho al igual que el filamento, se compone de 11 protofilamentos (Wagenknecht *et al.*, 1982) y tiene un diámetro de 18 nm (Fujii *et al.*, 2017). El gancho se ensambla mediante la proteína FlgD, que es necesaria para la polimerización de FlgE (Ohnishi *et al.*, 1994).

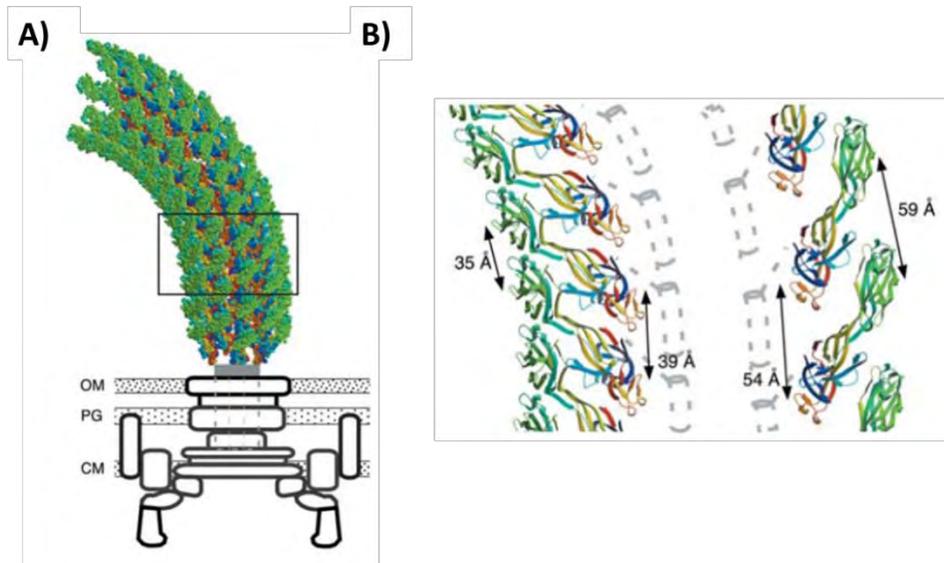
FlgE está formado por cuatro dominios: D0, Dc, D1 y D2. En la estructura cristalográfica del núcleo de FlgE de *S. enterica*, es decir, sin los extremos amino y carboxilo, se observa que los dominios D1 y D2 están formados principalmente por hojas  $\beta$  (Fig. 4A). Las interacciones axiales intersubunidades ocurren mediante los dominios D1 y D2 y son de

tipo polar-polar o polar-carga (Samatey *et al.*, 2004). El arreglo de FlgE en la estructura del gancho es similar al de la flagelina en el filamento, ya que en la parte más externa se encuentra el dominio D2, seguido del dominio D1 y al interior se encuentra el dominio Dc así como extremos carboxilo y amino que forman el dominio D0 (Fig. 4B y C) (Fujii *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estructura de FlgE y el gancho. A) En la parte inferior se muestra el dominio D1 y en la parte superior el dominio D2. B) Vista lateral. Acoplamiento molecular de la estructura cristalográfica de FlgE en un mapa de densidad de un gancho recto. Se muestran los dominios que conforman a la proteína del gancho. C) Vista superior del acoplamiento molecular. Barra de escala: 5 nm (Tomado de Samatey *et al.*, 2004 y Fujii *et al.*, 2009).

El gancho de *S. enterica* es curvo (Fig. 5A), por lo tanto, mientras el flagelo gira, las distancias repetidas entre los protofilamentos adyacentes del gancho, deben sufrir cambios conformacionales, es decir, una extensión y compresión de forma axial. Las distancias se comprimen y extienden por 6-8 Å para el D1 y, 11-13 Å para el D2 (Fig. 5B), estas medidas se obtuvieron tomando en consideración que en el gancho recto las distancias repetidas son de 46 Å (Samatey *et al.*, 2004). Además, las interacciones intersubunidades de los diferentes dominios de forma radial, le confieren estabilidad estructural a la estructura del gancho. Mientras que, los espacios de los dominios de forma axial, le permiten al gancho tener flexibilidad y rigidez en la torsión. Estas características le permiten a esta estructura desempeñar el papel de conector universal (Fujii *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Modelo atómico de un gancho curvo. A) Representación esquemática del gancho en el flagelo. B) Acercamiento de la imagen en A. Se muestran los cambios conformacionales de los dominios de acuerdo a la curvatura. En líneas punteadas grises, se esquematiza el dominio D0 que corresponde a los extremos carboxilo y amino (Tomado de Samatey *et al.*, 2004).

### Cuerpo basal

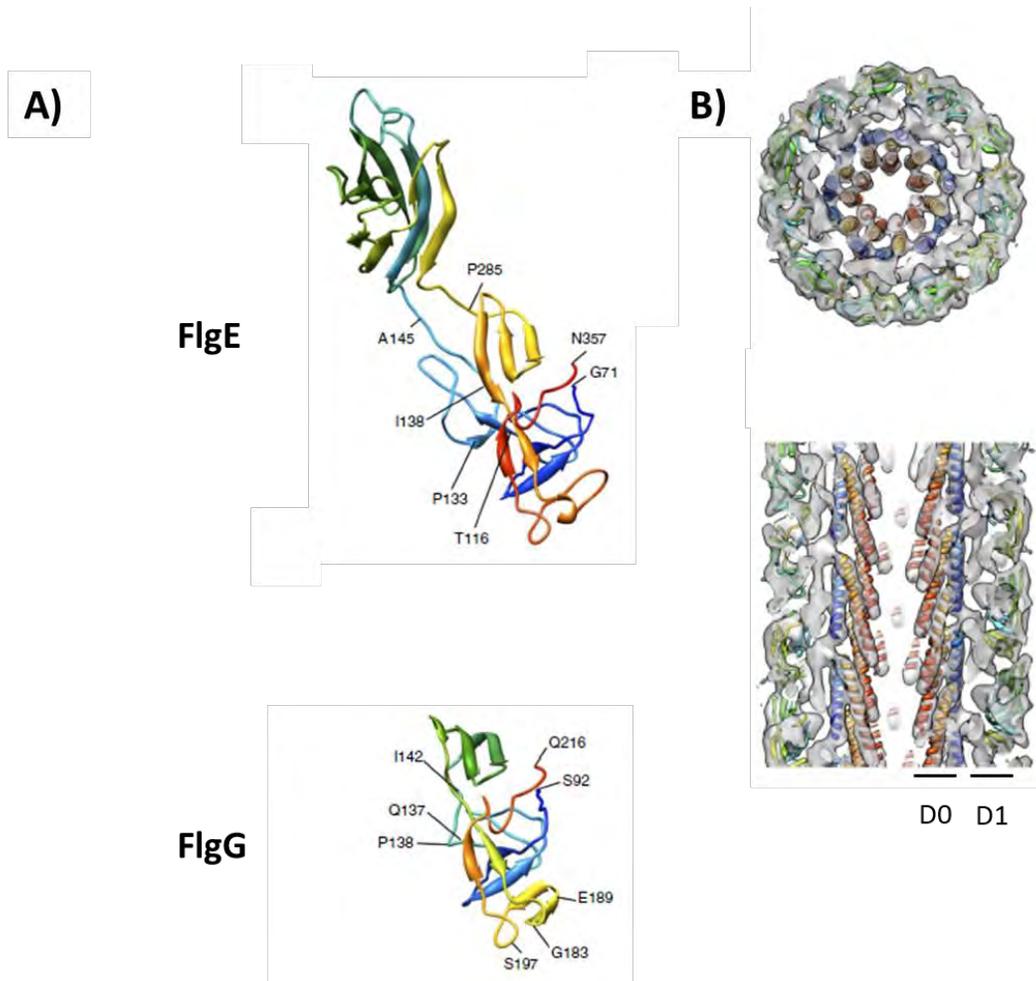
El cuerpo basal consiste en el eje, cuatro anillos coaxiales (C, MS, P y L), que llevan sus nombres de acuerdo a la posición subcelular en la que se encuentran: anillo citoplásmico (C); anillo en la membrana y supramembrana (MS); anillo asociado a la capa de peptidoglicano (P) y anillo asociado a la membrana externa o lipopolisacárido (L), el aparato de exportación, así como el complejo estator.

El eje es una estructura que funciona para transmitir la fuerza generada por el motor hacia el gancho y filamento y posee una longitud de 21.5 nm compuesta por 5 proteínas: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG (Kubori *et al.*, 1992). Y se puede dividir en un eje proximal (FliE, FlgB, FlgC y FlgF) de 10 nm y un eje distal (FlgG) de 11.5 nm (Takahashi *et al.*, 2009). Se ha sugerido el orden de ensamblaje de estas proteínas, el cual comienza con FliE, después FlgB (Minamino *et al.*, 2000c). Seguida de FlgC y FlgF que para el caso de *Borrelia burgdorferi* (Zhao, *et al.*, 2013) se ha propuesto que se ensambla primero FlgC y después FlgF, mientras que para *Rhodobacter sphaeroides* el orden propuesto es FlgF seguida de FlgC (Osorio-Valeriano, *et al.*, 2015). Y por último, se ensambla FlgG. Estas cinco proteínas son incorporadas en la estructura del eje en un orden que es determinado por las interacciones

específicas entre estas proteínas (Zhao, *et al.*, 2013; Osorio-Valeriano, *et al.*, 2015).

Las proteínas del eje poseen un porcentaje de identidad muy alto entre ellas y con FlgE, se piensa que estas proteínas estructurales axiales se originaron por eventos de duplicación (Liu y Ochman, 2007). Un modelado *in silico* de las secuencias de FlgB, FlgC, FlgF y FlgG mostró que la estructura de estas proteínas se parece a la de FlgE y FliC. Se pudieron distinguir dos dominios estructurales diferentes: el dominio central y los extremos amino y carboxilo, que corresponden a los dominios D1 y D0 de las proteínas del gancho y filamento, respectivamente (Osorio-Valeriano, *et al.*, 2015). De hecho, en un modelo de FlgG construido a partir de la estructura de FlgE, se observó que las estructuras terciarias son muy similares (Fig. 6). FlgG se encuentra conformada por los dominios D1 y D0, formados principalmente por hojas  $\beta$  como en el gancho. Los dominios están altamente empaquetados, este arreglo le confiere rigidez a esta estructura, esta característica es muy importante para mantener estabilidad a las velocidades altas a las que rota el flagelo. A pesar de que la secuencia y el plegamiento entre FlgG y FlgE es casi idéntico, las diferencias de empaquetamiento e interacciones axiales permiten que las dos estructuras, es decir, eje y gancho, desempeñen diferentes funciones mecánicas (Fujii *et al.*, 2017).

Entre el eje y gancho no hay proteínas adaptadoras, como ocurre en el caso de gancho y filamento. El arreglo de los dominios es lo suficientemente similar, permitiendo que la interacción entre eje y gancho sea mecánicamente estable (Fujii *et al.*, 2017).



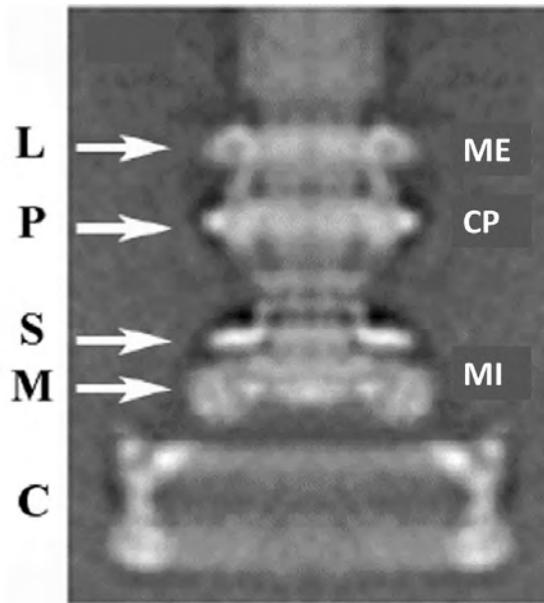
**Figura 6.** Comparación entre FlgE y FlgG. A) Estructura cristalográfica de FlgE (arriba) que se utilizó para hacer un modelo por homología de FlgG (abajo). B) Mapa de densidad del eje (FlgG), vista superior y vista lateral. Se indican los dominios D0 y D1 (Modificado de Fujii *et al.*, 2017).

El anillo MS se conforma por 26 copias de una única proteína, FliF. Esta estructura se localiza en la membrana interna de la bacteria (Fig. 7) e interactúa en la parte periplásmica con el eje, mientras que el extremo carboxilo de FliF, que se encuentra en el citoplasma, está involucrado en la interacción directa con FliG (Anillo C, Fig. 7) (Jones *et al.*, 1990; Francis *et al.*, 1992; Sosinsky *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1992; Grünenfelder *et al.*, 2003).

El anillo C (Fig. 7) se compone por las proteínas FliG, FliM y FliN (Francis *et al.*, 1994). Se sabe que la interacción entre el anillo MS y C ocurre a través del extremo carboxilo de FliF y el extremo amino de FliG (Marykwas *et al.*, 1996), por lo tanto, se encuentran en una estequiometría de 1:1, es decir, 26 copias de FliG se encuentran en el anillo C (Francis

*et al.*, 1992). Mientras que para FliM y FliN el número de copias es variable, depende del estado de rotación del flagelo (Lele *et al.*, 2012). Se ha estimado que ambas proteínas forman un complejo estable que se encuentran en una estequiometría de FliM<sub>1</sub>:FliN<sub>4</sub> (Brown *et al.*, 2005), tomando en consideración esta relación, para la rotación CCW se ha encontrado que hay 36-44 y ~144 copias de FliM y FliN, respectivamente. Mientras que para rotación CW, se ha estimado ~114 copias de FliN y 28-34 copias de FliM (Zhao *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2006; Lele *et al.*, 2012; Delalez *et al.*, 2014). El intercambio de subunidades de FliM y a su vez de FliN, dependiendo del estado de rotación del flagelo, puede contribuir a incrementar la probabilidad de rotación de CCW a CW, ya que el número de subunidades de FliG en estado CCW es mayor y por lo tanto, el número de sitios de unión de CheY-P (Lele *et al.*, 2012), proteína señalizadora que permite el cambio en la rotación (Ver sección quimiotaxis).

El anillo C es un complejo multiproteico que también es conocido como el complejo del interruptor, esta estructura es importante en la generación del torque (FliG) (Lloyd *et al.*, 1996) así como en el cambio de rotación del motor del flagelo (FliM) (Welch *et al.*, 1993). Aunque el papel de FliN sigue siendo estudiado, se ha sugerido que tiene implicaciones en la exportación, pues interactúa con el aparato de exportación (FliH) (González-Pedrajo *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2006). Asimismo, FliN está implicada con el mecanismo de cambio de rotación, ya que se ha reportado que CheY en su estado fosforilado puede interactuar con FliN (Paul *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2010). En conjunto, los anillos MS y C forman parte del rotor, es decir, la parte rotatoria del flagelo.

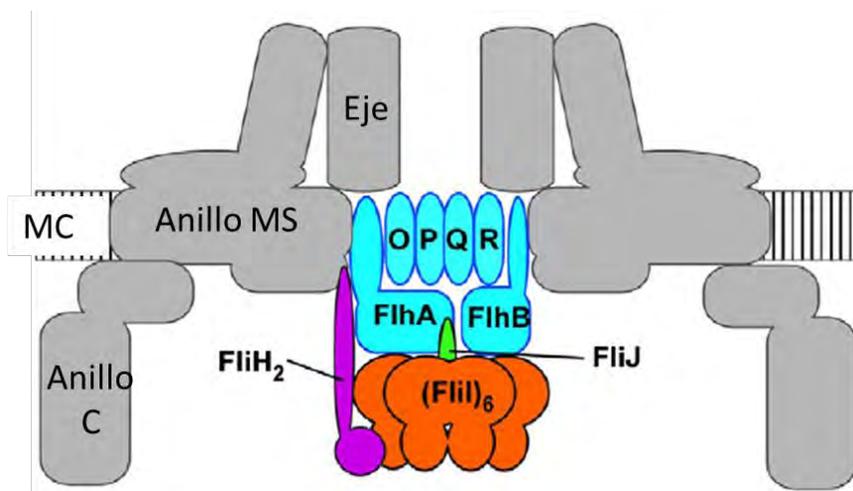


**Figura 7.** Micrografía electrónica del cuerpo basal de *S. enterica*. Se indican las posiciones correspondientes a los diferentes anillos (L, P, MS y C). ME: membrana externa; CP: capa de peptidoglicano y MI: membrana interna (Modificado de Thomas *et al.*, 2001).

Los anillos L y P se componen de 26 copias de las proteínas FlgH y FlgI, respectivamente (Jones *et al.*, 1990). El primero se asocia a la membrana externa y el segundo a la pared de peptidoglicano (Fig. 7) (Jones *et al.*, 1987; Schoenhals y Macnab, 1996). Se ha sugerido que el papel de estos anillos es formar un forro que permite la rotación del eje (Akiba *et al.*, 1991).

El aparato de exportación asiste en la secreción de sustratos flagelares, pues muchas de las subestructuras que conforman el flagelo se encuentran externas a la membrana citoplasmática. Esta estructura se compone de seis proteínas de membrana que son FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR y tres proteínas solubles FliH, FliJ y FliI, esta última proteína con actividad de ATPasa (Dreyfus *et al.*, 1993; Fan y Macnab, 1996; Minamino y Macnab, 1999; Minamino y Macnab, 2000a) (Fig. 8). Por medio de microscopía electrónica de fractura por congelamiento se sugirió que el aparato de exportación se encuentra en el centro de los anillos MS y C (Katayama *et al.*, 1996). Sin embargo, en *Escherichia coli* con el uso de la fusión FlhA-YFP, se encontró que el número de subunidades que se encuentran asociadas al motor es muy alto y por lo tanto FlhA podría encontrarse entre los anillos MS y C o formando poblaciones dentro y fuera del anillo MS (Li y Sourjik, 2011).

Esta maquinaria de exportación se encuentra relacionada evolutivamente al sistema de secreción tipo III conocido como inyectisoma (Abby y Rocha, 2012), el cual se usa para la secreción de efectores tanto en bacterias patogénicas como en aquellas que mantienen interacciones simbióticas (Galán *et al.*, 2014).

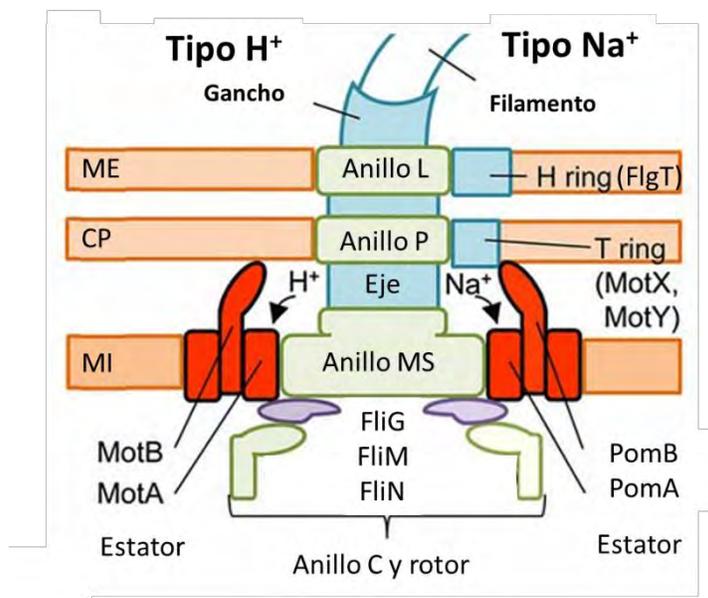


**Figura 8.** Aparato de exportación. Se muestra un esquema con las diferentes proteínas que conforman el aparato de exportación específico para el flagelo. FliO (O), FliP (P), FliQ (Q) y FliR (R). MC: Membrana celular (Modificado de Minamino, 2014).

El estator es la parte no rotatoria del flagelo, esta estructura funciona como un translocador que utiliza el potencial electroquímico de ciertos iones para convertirlo en trabajo mecánico. Los estatores se pueden dividir en dos tipos: aquellos que utilizan la fuerza protón-motriz o los que usan sodio-motriz. Los primeros están constituidos por MotA y MotB y los segundos por PomA y PomB (Fig. 9). En *E. coli*, el estator utiliza la fuerza protón motriz, y puede alcanzar velocidades de 300 Hz o más (Chen y Berg, 2000). Mientras que en *Vibrio alginolyticus*, que utiliza el motor energizado por iones sodio, el flagelo alcanza velocidades de rotación de hasta 1,700 Hz (Magariyama *et al.*, 1994).

El estator compuesto por PomA/PomB se ha reportado la presencia de estructuras adicionales que son requeridas para su apropiado funcionamiento: el anillo T y el anillo H (Fig. 9, lado derecho). El anillo T está compuesto por las proteínas MotX y MotY (Terashima *et al.*, 2006) y el anillo H por FlgT (Terashima *et al.*, 2010). Se ha propuesto que estas estructuras sirven para tener un motor más robusto para resistir las velocidades de rotación

tan altas que ocurren en los motores que utilizan sodio (Terashima *et al.*, 2006; Terashima *et al.*, 2010).

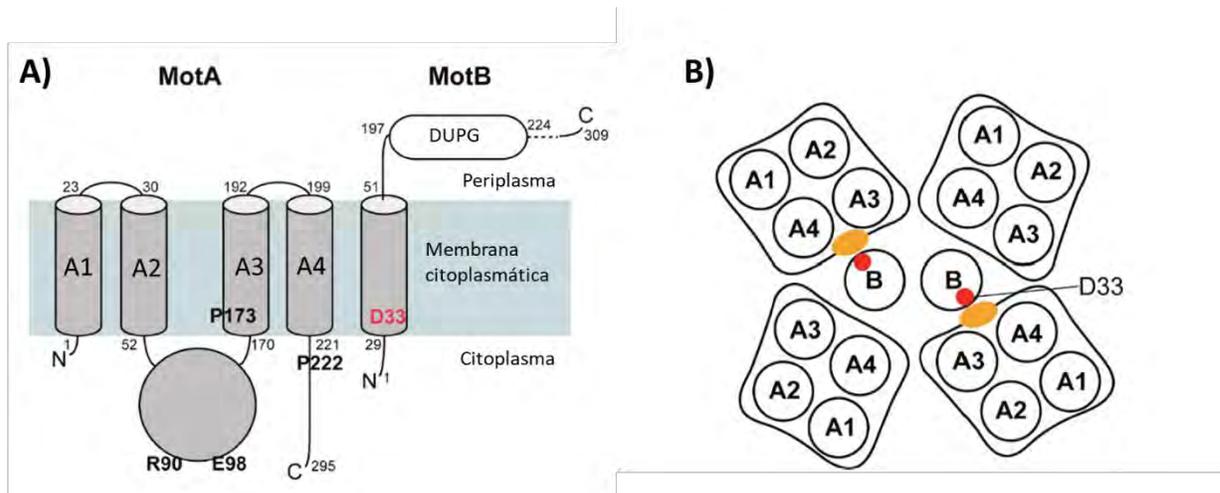


**Figura 9.** Esquema del motor flagelar. Se pueden observar los tipos de estatores, que utilizan la fuerza protón motriz (izquierda) o sodio motriz (derecha) (Modificado de Nishihara y Kitao, 2015).

MotA y PomA son proteínas que poseen 4 cruces transmembranales (A1-A4), con dos segmentos periplásmicos cortos, además posee dos regiones citoplásmicas, la primera entre los cruces 2 y 3, y la segunda en el extremo carboxilo (Dean *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1995; Nguyen y Saier, 1996). Mientras que MotB y PomB poseen un cruce transmembranal y una región periplásmica grande, en el cual se encuentra un dominio de unión al peptidoglicano (Chun y Parkinson, 1988) que ancla el estator a la pared celular (Fig. 10a). Además, en una región periplásmica adyacente al cruce transmembranal de MotB, existe una hélice anfipática denominada tapón (del inglés, *plug*), la cual se ha propuesto que regula el estado abierto o cerrado para la translocación de protones (Hosking *et al.*, 2006). De esta forma, se ha sugerido que los complejos estatores se encuentran en la membrana citoplásmica en estado cerrado, una vez que se reclutan al flagelo, las interacciones con el rotor permitirían que ocurran cambios conformacionales que abren el canal y se ancle el dominio de unión al peptidoglicano (Van Way *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2009).

La estequiometría entre los componentes del estator ya se determinó y se encontró

que es de cuatro subunidades de MotA/PomA y dos de MotB/PomB (Sato y Homma, 2000; Kojima y Blair, 2004; Yorimitsu *et al.*, 2004), por lo tanto, un arreglo MotA<sub>4</sub>MotB<sub>2</sub> o PomA<sub>4</sub>PomB<sub>2</sub> forma un complejo estator (Fig. 10b). Mediante microscopía electrónica de fractura por congelamiento, se observaron unas partículas que rodean a la base del flagelo y corresponden a los complejos estatores, en el caso de *E. coli* pueden ser de 10 a 12 (Khan *et al.*, 1988). Sin embargo, se sabe que el número de complejos estatores puede cambiar de acuerdo al radio del anillo C (Beeby *et al.*, 2016) así como con la dinámica de estos complejos, pues no permanecen estáticos en el motor (Leake *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Complejo estator del flagelo. Se muestra únicamente aquel que utiliza la fuerza protón motriz. A) Topología de MotA y MotB. Se señalan los residuos importantes para el torque y el dominio de unión al peptidoglicano (DUPG). A1-A4 indican los segmentos transmembranales de MotA B) Arreglo de las subunidades de MotA y MotB en un complejo estator. Se señala el residuo protonable en MotB (D33) con un círculo rojo y el posible canal del complejo con un óvalo anaranjado (Modificado de Morimoto y Minamino, 2012).

## Torque

El estator actúa como un canal de H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> que acopla el flujo de éstos con la generación del torque, es decir, la fuerza generada por el motor. En esta sección se tomará en cuenta únicamente el complejo formado por MotA<sub>4</sub>MotB<sub>2</sub>.

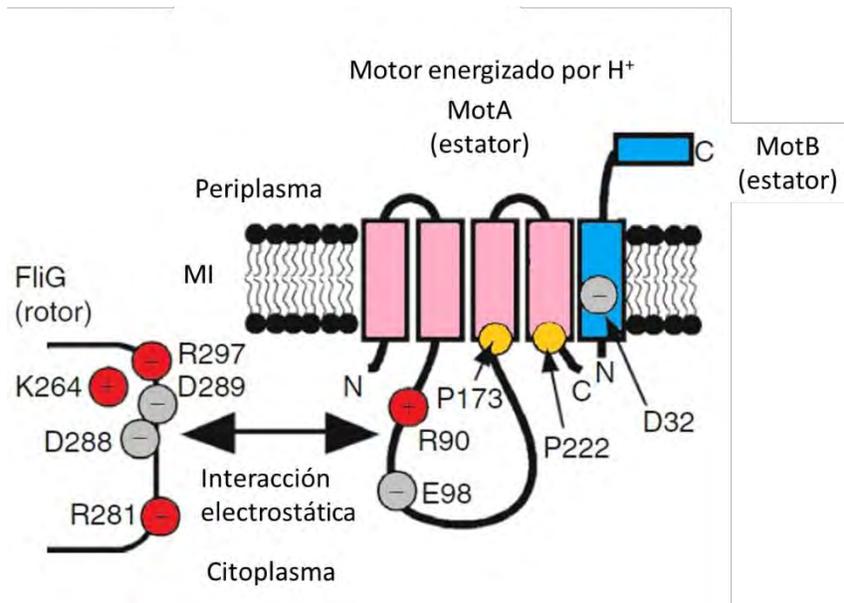
El residuo D32 para *E. coli* o D33 para *S. enterica* de MotB se encuentra altamente conservado y es esencial para la rotación, pues es el único residuo protonable del motor (Zhou *et al.*, 1998). En un complejo estator se encuentran dos copias de MotB, en las cuales las

posiciones de D32 se encuentran en superficies separadas, es decir, por cada complejo estator hay dos canales de protones (Fig. 10b) (Braun y Blair, 2001). No se conoce con exactitud el camino que recorre el protón, sin embargo, considerando que únicamente el estator y no así el rotor, puede unir protones, se ha sugerido que el modo de comunicación entre éstos se debe a cambios conformacionales inducidos por la protonación (Zhou *et al.*, 1998a). Por lo tanto, las interacciones electroestáticas entre el estator (MotA) y el rotor (FliG) permiten el correcto alineamiento entre ambos, así como la generación del torque (Zhou *et al.*, 1998b; Lloyd y Blair, 1997; Yakushi *et al.*, 2006; Morimoto *et al.*, 2013). Actualmente se ha propuesto que los residuos cargados (MotA R90 y E98; FliG D289, R297, D288, R281 y K264) (Fig. 11), son importantes para reclutar los estatores y generar el torque pero ninguno de ellos, por sí solos, es totalmente indispensable (Lloyd y Blair, 1997; Zhou y Blair, 1997; Zhou *et al.*, 1998b; Morimoto *et al.*, 2013), más bien lo es el conjunto de éstos.

Con base en la estequiometría y estudios de entrecruzamiento, se ha propuesto un modelo en el que las dos subunidades de MotB, se encuentran al interior de complejo. Los segmentos transmembranales 1 y 2 de MotA se encontrarían más expuestos hacia la fase lipídica (Kim *et al.*, 2008), mientras que los segmentos 3 y 4 forman la pared externa del canal encontrándose en contacto directo con el único segmento transmembranal de MotB (Fig. 10b) (Braun *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha propuesto que las hélices transmembranales 2, 3 y 4 formarían parte del canal, mientras que la hélice transmembranal 1 serviría como estabilizadora. Además, cabe señalar, que dos de las subunidades de MotA no forman un canal por lo que se ha propuesto que en la hélice transmembranal 4 el residuo Y217 de la subunidad formadora del canal tiene un contacto con P173 de la subunidad no formadora del canal, confiriendo cambios conformacionales similares entre los dos tipos de subunidades (Kim *et al.*, 2008).

Además de los residuos cargados que son importantes para la generación del torque, existen otros residuos que no están involucrados directamente en la interfase rotor-estator, éstos se encuentran en MotA. El residuo P173 de MotA posiblemente se encuentra en la parte interna del canal, cercano a D32 de MotB, tiene un papel relacionado con el movimiento del rotor y, además, regula el flujo de protones a través de la membrana. Mientras que P222 de MotA se encuentra cercano a la superficie citoplásmica y regula los cambios

conformacionales en el complejo estator (Fig. 11) (Braun *et al.*, 1999).



**Figura 11.** Interfase entre el rotor y el estator. Se muestran los residuos importantes en la generación del torque y alineamiento entre rotor-estator, así como el sitio de unión del protón (D32 de MotB) y los residuos involucrados en la conformación del estator (P173 y P222 de MotA) (Modificado de Terashima *et al.*, 2008).

### Jerarquía transcripcional y biogénesis flagelar

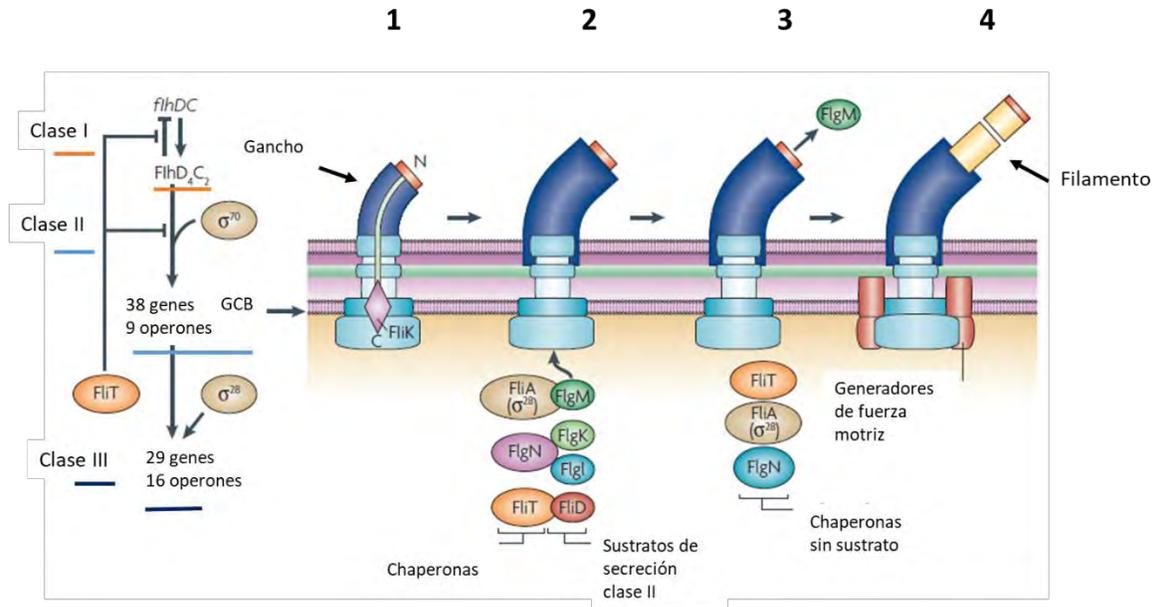
Durante la biogénesis del flagelo se regula la expresión de los diferentes componentes que lo conforman de forma jerárquica. Este proceso se encuentra ampliamente estudiado en *S. enterica* y *E. coli*, por lo que en esta sección se hará referencia a la información obtenida de estos organismos, sin embargo, cabe considerar que también se han estudiado otras bacterias como son *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa* y miembros de la familia *Vibrionaceae* (Ardissone y Viollier, 2015; McCarter, 2001; McCarter, 2006; Merino *et al.*, 2006).

Para la formación del flagelo los genes se encuentran arreglados en un orden jerárquico que se divide en tres clases (Kutsukake *et al.*, 1990). En la cascada jerárquica, se expresan primero los genes de clase I. Estos codifican para el regulador maestro FlhDC que forma un complejo hetero-oligomérico (FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub>) (Wang *et al.*, 2006) el cual funciona como activador transcripcional de los genes de clase II que son dependientes de  $\sigma^{70}$  (Liu y Matsumura, 1994). Los genes de clase II codifican para proteínas que constituyen el cuerpo

basal y el gancho, así como proteínas regulatorias de los genes de clase III. Los genes de clase III incluyen las proteínas asociadas al gancho (FlgK y FlgL), el tapón (del inglés, *cap*) de la flagelina (FliD), la flagelina (FliC), el estator (MotA y MotB) así como el sistema quimiotáctico. Los genes pertenecientes a esta última clase son dependientes de  $\sigma^{28}$  o FliA (Ohnishi *et al.*, 1990) que a su vez se encuentra inactivo por el factor antisigma FlgM impidiendo su unión a la RNA polimerasa (Ohnishi *et al.*, 1992). Una vez que el gancho se termina de ensamblar, FlgM se secreta al medio extracelular (Karlinsky *et al.*, 2000) liberando a FliA (Fig. 12).

A parte de la regulación de los genes de clase III por FlgM, existen otros puntos de regulación, uno de ellos lo controla por FliT, una proteína que impide la unión de FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub> al ADN y que inhibe la expresión de los genes de clase II (Fig. 12). Este es un mecanismo de expresión fina en el que FliT se encuentra unida a FliD (Fraser *et al.*, 1999; Kutsukake *et al.*, 1999) durante la biogénesis del gancho-cuerpo basal, una vez que es completada, FliD se libera y se secreta al medio. Entonces, FliT puede unirse a FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub> inhibiendo su papel como activador transcripcional (Yamamoto y Kutsukake, 2006).

Otro punto de regulación es controlado por FlhDC que puede fungir como activador de los genes de clase II pero también como inhibidor de su propia transcripción (Fig. 12) (Kutsukake, 1997). También se ha reportado que FliZ es una proteína que regula de forma positiva a los promotores de clase II (Kutsukake *et al.*, 1999), el mecanismo de acción de FliZ es a través de la estabilización del complejo FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub> el cual a su vez, incrementa la expresión de los genes de clase II (Saini *et al.*, 2008).



**Figura 12.** Acoplamiento entre la regulación de los genes flagelares y el ensamblaje del flagelo. Los genes de clase I codifican para el regulador maestro FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> que enciende la expresión de los genes de clase II. Éstos codifican para los componentes estructurales del gancho-cuerpo basal (1) así como algunas proteínas regulatorias como FlgM, FliA y FliT. Mientras el gancho-cuerpo basal se está ensamblando, FlgM secuestra a FliA que impide la expresión de los genes de clase III (2). Una vez que se finaliza la formación del gancho, FlgM se secreta al medio extracelular para así liberar a FliA. A su vez las chaperonas FlgN y FliT entregan sus sustratos al aparato de exportación. Entonces FliT puede reprimir la expresión de los genes de clase I y II por unión a FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub> (3). Cuando FliA es liberado, se puede iniciar la expresión de los genes tardíos que incluyen a la proteína del filamento, los componentes generadores del torque y las proteínas de la vía de señalización quimotáctica (4). GCB: Gancho-Cuerpo Basal (Modificado de Chevance y Hughes, 2008).

El ensamblaje empieza con las estructuras más proximales hacia las más distales. Este proceso tiene algunas ligeras diferencias entre *E. coli* y *S. enterica*. En el caso de *E. coli* la biogénesis comienza con FlhA, seguido de la formación del anillo MS en la membrana interna. Posteriormente, justo debajo del anillo MS, se ensambla FliG al cual se le une el complejo FliM-FliN, formando el anillo C. Después se ensamblan los componentes citosólicos del aparato de exportación, es decir, FliH y FliI. Aunque no está claro en qué momento se ensamblan el resto de los componentes del aparato de exportación (Li y Sourjik, 2011). Mientras que en *S. enterica* la biogénesis empieza con la formación del anillo MS y FliG de forma cooperativa, seguida del aparato de exportación. Posteriormente se ensamblan FliM y FliN y por último FliH, FliI y FliJ (Kubori *et al.*, 1992; Kubori *et al.*, 1997; Morimoto

*et al.*, 2014). El ensamblaje de estas subestructuras es cooperativo y no estrictamente secuencial, es decir, los pasos subsecuentes de ensamblaje estabilizan la estructura ya existente (Li y Sourjik, 2011).

El aparato de exportación es una maquinaria específica del flagelo que permite la exportación de los diferentes componentes de las subestructuras axiales del flagelo que son reconocidas a través del extremo amino de los sustratos (Végh *et al.*, 2006). Las proteínas exportadas se dividen en dos tipos: los sustratos tipo eje/gancho y los sustratos de tipo filamento (Minamino y Macnab, 1999). El aparato de exportación posee una proteína con actividad de ATPasa (FliI) que forma un complejo con FliH y FliJ. Una mutante en FliI da como fenotipo un abatimiento en la exportación de sustratos. A pesar de ello, se ha demostrado que la hidrólisis de ATP no está involucrada directamente en la exportación, por lo que se ha sugerido que la actividad del complejo ATPasa puede facilitar la liberación de FliH-FliI de la puerta de exportación para que se puedan secretar los sustratos en una forma dependiente de la fuerza protón-motriz (Minamino y Namba, 2008). Por lo tanto, la fuente de energía utilizada para la exportación de los sustratos, se obtiene a partir de la fuerza protón-motriz y no mediante la hidrólisis de ATP (Paul *et al.*, 2008).

Entonces, el aparato de exportación coordina la exportación de los dos tipos de sustratos. Primero, el eje se empieza a ensamblar justo arriba del anillo MS, se ha sugerido que este proceso lo asiste FlgJ, pues se ha reportado su interacción con las proteínas del eje (Hirano *et al.*, 2001). Además, FlgJ posee un dominio de muramidasa mediante el cual puede degradar la capa de peptidoglicano para permitir la penetración del eje (Nambu *et al.*, 1999). Se ha propuesto que la longitud del eje es determinada por el contacto con la membrana externa (Cohen *et al.*, 2017). Por otra parte, las proteínas FlgI, FlgH y FlgA son exportadas a través de la vía Sec. FlgA funge como chaperona periplásmica que permite la polimerización FlgI que forma el anillo P (Nambu y Kutsukake, 2000) y posteriormente se ensambla el anillo L (FlgH). Una vez formado el anillo L, éste libera a FlgJ de la punta distal del eje (Cohen y Hughes, 2014), permitiendo que FlgD se una y ensamble al gancho (Ohnishi *et al.*, 1994).

El cambio en la exportación de sustratos eje-gancho a filamento, ocurre debido a la interacción entre FliK y FlhB. FliK es exportada intermitentemente al medio extracelular

mientras el gancho se está ensamblado. Conforme el gancho adquiere la longitud adecuada, la probabilidad de interacción de la región carboxilo terminal de FliK con FlhB incrementa. Es esta interacción permite el cambio de exportación en los substratos a los del tipo del filamento (Erhardt *et al.*, 2011).

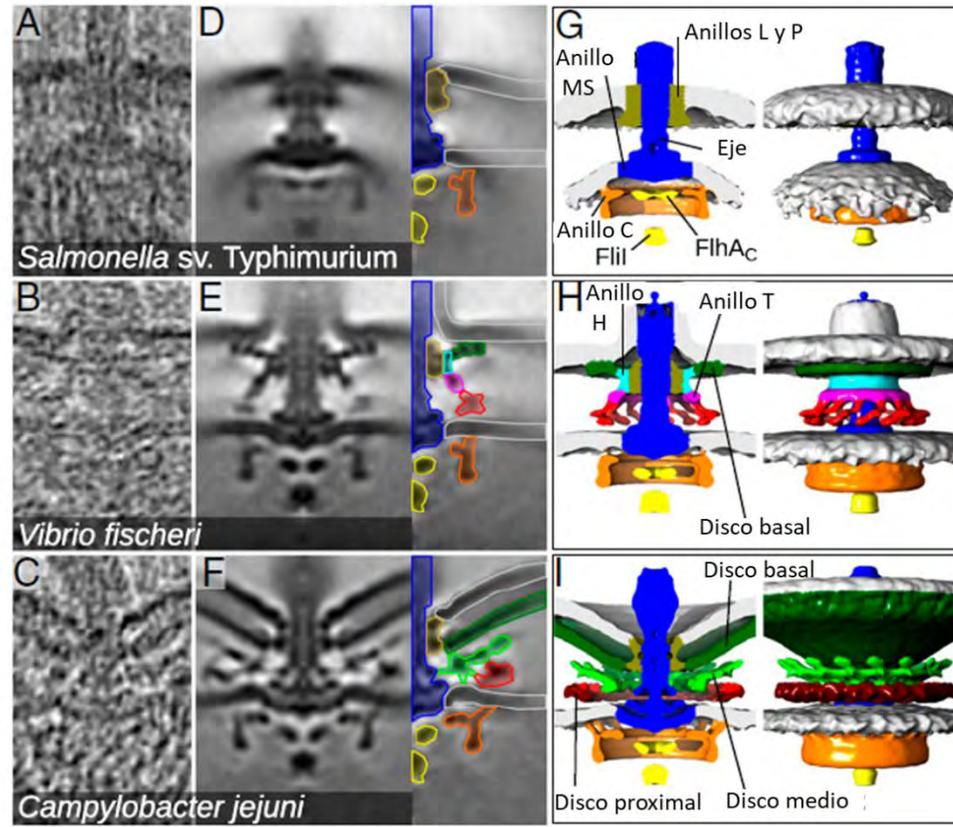
FlhB es una proteína que tiene 4 cruces transmembranales (FlhB<sub>TM</sub>) y un dominio carboxilo terminal citosólico (FlhB<sub>C</sub>) dividido en FlhB<sub>CN</sub> y FlhB<sub>CC</sub>. En FlhB<sub>C</sub> se encuentra la secuencia NPTH en la cual ocurre una autoproteólisis entre los residuos N269 y P270 (Ferris *et al.*, 2005), que genera dos productos: FlhB<sub>TM+CN</sub> y FlhB<sub>CC</sub> (Minamino y Macnab, 2000b). La mutación puntual N269A en FlhB impide el corte, como consecuencia la secreción de substratos se mantiene bloqueada en los del tipo eje/gancho (Fraser *et al.*, 2003). A pesar del corte proteolítico en el dominio citosólico, los productos resultantes se mantienen fuertemente unidos (Minamino y Macnab, 2000b), por lo que se ha sugerido que no es el corte el responsable del cambio en la especificidad de reconocimiento de los substratos, sino que ocurren cambios conformacionales en FlhB<sub>CN+CC</sub> ocasionados por FliK (Minamino y Macnab, 2000b; Minamino, 2014).

Para la secreción de los substratos de tipo filamento se requieren chaperonas. FlgN es la chaperona de FlgK y FlgL, FliT de FliD (Fraser *et al.*, 1999) y FliS de FliC (Auvray *et al.*, 2001). Estos complejos chaperona-substrato se forman en el citosol, después interactúan temporalmente con el anillo C a través de FliH<sub>2</sub>-FliI (Thomas *et al.*, 2004; González-Pedrajo *et al.*, 2006; Minamino *et al.*, 2012). Posteriormente, la interacción entre FliJ con FliH, libera el complejo FliJ-FliH<sub>2</sub>-FliI-chaperona-substrato del anillo C (González-Pedrajo *et al.*, 2006) y tiene contacto con la plataforma de acoplamiento conformada por los dominios carboxilo terminal citosólicos de FlhA y FlhB. Entonces FliJ promueve la formación de un hexámero de FliI (Ibuki *et al.*, 2011) esto permite la entrada inicial del extremo amino del substrato a exportar en la puerta de exportación. La hidrólisis de ATP, desestabiliza el complejo FliH<sub>2</sub>-FliI<sub>6</sub> de la puerta de exportación y entonces la secreción puede ocurrir energizada por la fuerza protón motriz (Minamino y Namba, 2008).

Por último, se ensamblan los componentes del sistema quimiotáctico, así como los complejos estatores, los cuales son independientes del orden de ensamblaje del flagelo, pero no de la jerarquía.

## **Diversidad de estructuras en el flagelo**

Los sistemas flagelares mejor estudiados pertenecen a *S. enterica* y *E. coli*, sin embargo, con el desarrollo de la criotomografía electrónica ha sido posible visualizar los motores flagelares de células intactas de diferentes bacterias (Chen *et al.*, 2011). Se han observado estructuras adicionales en los motores de bacterias no entéricas (Fig. 13), por ejemplo, una estructura tipo jaula en *Helicobacter pylori* (Qin *et al.*, 2016), el collar en espiroquetas (Moon *et al.*, 2016) o los complejos disco en *C. jejuni* y *V. fischeri* (Beeby *et al.*, 2016). La función de estas nuevas estructuras no es del todo clara, pero se han asociado con los complejos estatores e incluso se ha propuesto que sirven para el reclutamiento de más complejos estatores pues el torque generado por los motores de estas bacterias es mayor al de bacterias entéricas. Esto sugiere una estrategia de adaptación del motor para el ambiente en el que viven (Beeby *et al.*, 2016). Estas estructuras únicas reflejan que los motores flagelares son estructuralmente diversos.



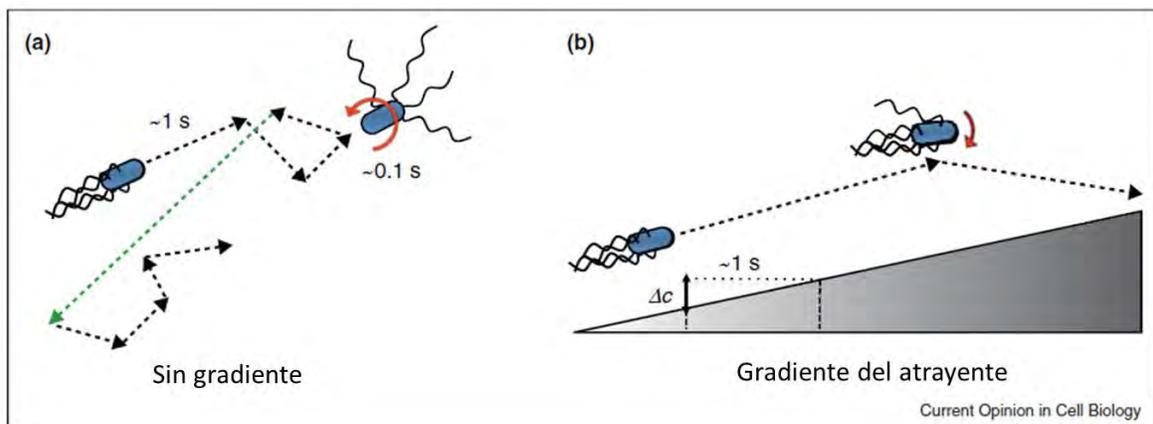
**Figura 13.** Motores flagelares de diferentes bacterias. Tomografías de células intactas de A) *S. enterica*, B) *V. fischeri* y C) *C. jejuni*. Subtomogramas (D, E y F) de los organismos indicados. Representaciones esquemáticas construidas a partir de los subtomogramas: se muestra G) la base estructural del motor de *S. enterica*, H) los anillos H y T, así como el disco basal presente en *V. fischeri* y I) los tres complejos disco de *C. jejuni*.

## Quimiotaxis

La capacidad de desplazarse es una ventaja adaptativa si hay un mecanismo para controlarla. El movimiento dirigido se conoce como taxis, por medio del cual las bacterias pueden dirigirse hacia ambientes más favorables y alejarse de aquellos que no lo son. La quimiotaxis, es el movimiento dirigido causado por estímulos químicos o quimioefectores. En el caso de *E. coli* y *S. enterica*, cuando los motores flagelares rotan en dirección CCW, los filamentos de los flagelos forman un haz que permite a las bacterias desplazarse hacia adelante, pero cuando al menos uno cambia a dirección CW, el haz o trenza se deshace y entonces las bacterias paran y pueden reorientarse. La quimiotaxis modula la frecuencia de los eventos de reorientación (Wadhams y Armitage, 2004). A pesar de las variaciones en los

flagelos, el nado dirigido siempre se basa en el sistema quimiodetector y su forma de regular al motor, ya sea cambiando de dirección, parando o regulando la velocidad (Armitage y Schmitt, 1997).

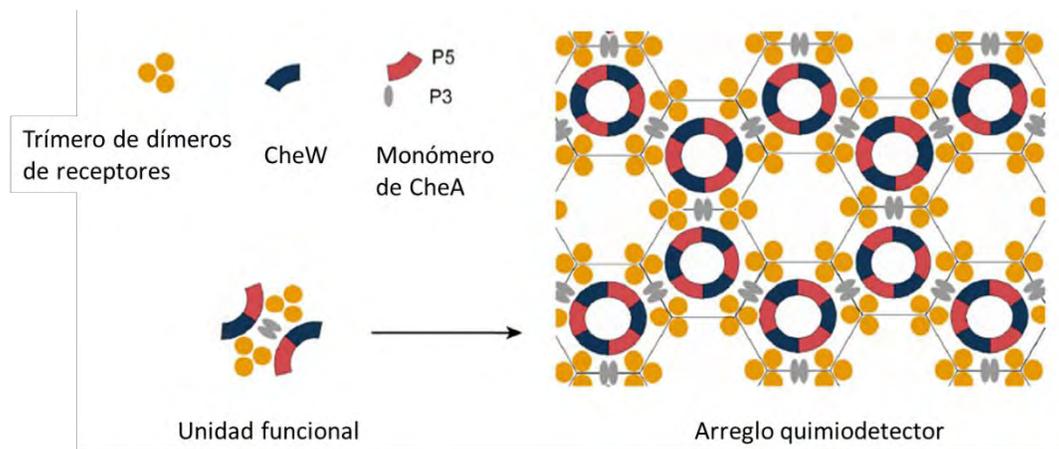
En un ambiente isotrópico, los eventos de paro-reorientación y nado son azarosos no existe un desplazamiento neto. Mientras que, cuando existe un gradiente de concentración, los eventos de paro-reorientación disminuyen y la bacteria puede desplazarse, esto se denomina como *nado con sesgo* (Fig. 14). Ahora se sabe que el ángulo de reorientación en ausencia de un gradiente de concentración, depende del número de flagelos rotando en dirección CW (Fig. 14a). Por otra parte, en el nado con sesgo, pocos flagelos cambian de dirección, por lo tanto, el grado de reorientación de la célula es menor (Fig. 14b) (Sourjik y Wingreen, 2012).



**Figura 14.** Patrón quimiotáctico de *E. coli*. A) *Nado azaroso* en un ambiente isotrópico. El nado puede durar varios segundos, pero es interrumpido por un evento de paro seguido de la reorientación de la célula. B) *Nado con sesgo* en presencia de un gradiente de concentración. Las células se dirigen al atrayente, aumentando el tiempo de nado antes de reorientarse (Modificado de Sourjik y Wingreen, 2012).

La vía de señalización, consiste en un sistema de dos componentes, en el cual un receptor membranal, con actividad de cinasa, detecta un ligando en el periplasma, entonces se autofosforila y posteriormente fosforila a un regulador de respuesta, que posee un dominio conservado, denominado REC (del inglés, *RECeiver*). Este dominio enciende una respuesta adaptativa. Esta señalización consiste en fosforelevos de un residuo de His a uno de Asp (Wadhams y Armitage, 2004).

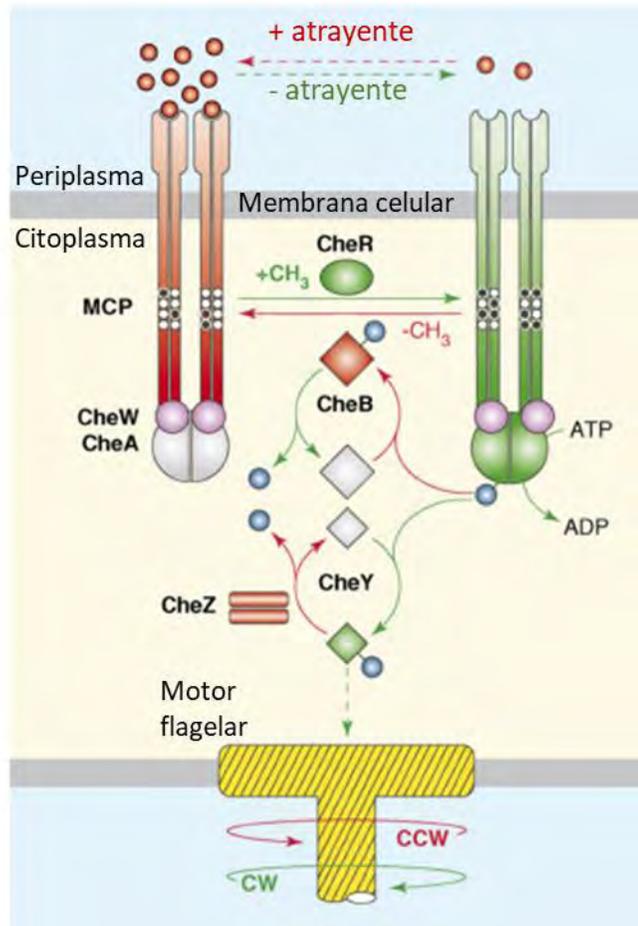
El sistema quimiotáctico de *E. coli* es uno de los mejor caracterizados. Se compone de los receptores membranales conocidos como proteínas quimiotácticasceptoras de metilo o MCP (del inglés, *Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*). Las MCPs pueden detectar un ligando, en el periplasma, directamente o a través de una proteína de unión periplásmica o PBP (del inglés, *Periplasmic Binding Protein*). En la parte citoplásmica, interactúan con la proteína histidín cinasa CheA a través de la proteína adaptadora CheW. La unidad funcional está compuesta de dos hetero-trímeros de homo-dímeros de MCPs, dos CheW y un dímero de CheA. Las unidades funcionales forman complejos de señalización estables mediante un arreglo hexagonal (Fig. 15) (Bi y Lai, 2015; Parkinson *et al.*, 2015).



**Figura 15.** Arreglo del sistema quimiodetector. CheA posee cinco dominios (P1-P5), el dominio P3 sirve para la dimerización y el dominio P5 es de unión al quimiorreceptor y a CheW. Los trímeros de dímeros de MCPs forman arreglos hexagonales mediante interacciones en las regiones citoplásmicas, CheA y CheW (Modificado de Bi y Lai, 2015).

Cuando las MCP detectan un repelente o la ausencia de un atrayente, interactúan con CheW, que es la proteína adaptadora, ésta transmite la señal hacia la cinasa CheA. CheA, se autofosforila y posteriormente le transfiere el grupo fosforilo al regulador de respuesta CheY (CheY-P). CheY-P posee una mayor afinidad hacia FliM, la unión de CheY-P a FliM resulta en un cambio en la dirección de la rotación del flagelo de CCW a CW. La señal se termina cuando CheZ desfosforila a CheY-P (Fig. 16). En contraste, la unión de un atrayente en las MCP, provoca la inhibición de la actividad de CheA y como consecuencia los niveles de CheY-P, el resultado es promover el nado por la rotación CCW del flagelo (Porter *et al.*, 2008; Bi y Lai, 2015; Parkinson *et al.*, 2015).

Dado a que las bacterias son organismos que detectan los gradientes de quimioefectores a través de comparaciones temporales, esta vía de señalización posee un sistema de adaptación que, en esencia, le permite comparar las condiciones actuales con las experimentadas recientemente, es decir, es un tipo de memoria. Este proceso se controla por los estados de metilación y desmetilación del receptor MCP a través de CheB y CheR. CheR es una metiltransferasa constitutivamente activa y CheB es una metilesterasa. La fosfotransferencia de CheA a CheB ocurre más lenta comparada con CheY, esto permite que el sistema quimiotáctico regule al motor antes de que el proceso de adaptación ocurra. CheB-P desmetila a las MCPs, de esta forma se desensibilizan los receptores y como consecuencia, la actividad de CheA regresa a un estado basal o de preestímulo (Fig. 16), esto le permite a la bacteria responder rápidamente a una nueva concentración de quimioefector (Wadhams y Armitage, 2004; Sourjik y Wingreen, 2012; Bi y Lai, 2015; Porter *et al.*, 2008).



**Figura 16.** Vía de señalización del sistema quimiotáctico de *E. coli*. El mecanismo para mantener la rotación CCW se muestra en rojo. Con la activación de CheA debido al receptor, genera una rotación CW, que se muestra en verde. Los componentes en gris son formas inactivas. Los sitios de metilación en MCP se muestran como círculos blancos si están desmetilados o negros si se encuentran metilados (Modificado de Hazelbauer *et al.*, 2008).

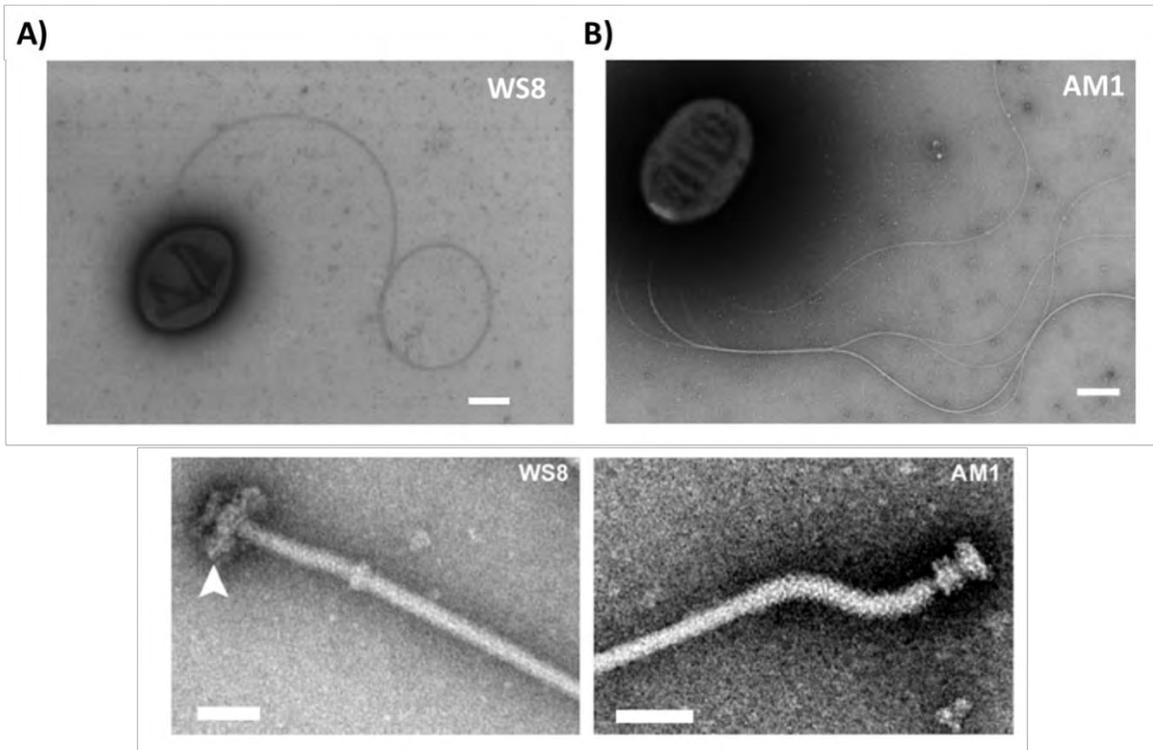
## Antecedentes

### *Rhodobacter sphaeroides*

*R. sphaeroides* es una bacteria púrpura no sulfurosa que pertenece al grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias. Esta bacteria presenta flexibilidad metabólica pues puede crecer en condiciones fotoheterotróficas o quimioheterotróficas. El genoma de la cepa WS8N de *R. sphaeroides* consta de 4.42 Mpb y está compartimentalizado en dos cromosomas (3.14 y 0.97 Mpb) y dos plásmidos grandes (200 y 110 kpb) (Porter *et al.*, 2011). Esta cepa posee dos conjuntos de genes flagelares (*fla1* y *fla2*). A diferencia de otras bacterias, en *R.*

*sphaeroides* ambos conjuntos de genes codifican para flagelos funcionales utilizados para el nado en medio líquido. Un análisis filogenético utilizando proteínas flagelares conservadas, mostró que *fla1* se adquirió por transferencia horizontal de un ancestro del grupo de las  $\gamma$ -proteobacterias, mientras que *fla2* corresponde a la herencia vertical de *R. sphaeroides*. Esta adquisición ocurrió no sólo en el grupo de las *Rhodobacterales* sino también en las *Sphingomonadales*, sin embargo, algunas de las bacterias de estos grupos perdieron los genes flagelares presentes en el linaje de las  $\alpha$ -proteobacterias. Esto sugiere que la conservación de *fla2* por *R. sphaeroides* es una selección positiva que podría ser ventajosa bajo ciertas condiciones (Poggio *et al.*, 2007).

La expresión de *fla1* ocurre de manera constitutiva en la cepa WS8N bajo condiciones de crecimiento de laboratorio y produce un único flagelo que emerge de un subpolo de la célula (Fig. 17A). En contraste, el sistema flagelar *fla2* codifica para varios flagelos polares (Poggio *et al.*, 2007) (Fig. 17B). Además, los dos flagelos presentan diferencias estructurales entre ellos, por ejemplo, Fla1 tiene el anillo H, conformado por la proteína FlgT (Fabela *et al.*, 2013). En Fla2 el filamento es más delgado y el gancho más grueso y en Fla1, HAP3 es más voluminosa (de la Mora *et al.*, 2015). Es importante resaltar que los dos sistemas flagelares son mutuamente excluyentes, no se expresan al mismo tiempo en la célula, aunque se desconoce el mecanismo que subyace en este fenómeno (Vega-Baray *et al.*, 2015).



**Figura 17.** Sistemas flagelares Fla1 y Fla2 de *R. sphaeroides*. Microscopías electrónicas de A) Fla1 en la cepa WS8N que surge del subpolo (arriba) y la estructura del filamento-gancho-cuerpo basal (abajo). Con una punta de flecha se indica el anillo H. B) El sistema flagelar Fla2 en AM1, mostrando varios flagelos polares (arriba) y el filamento-gancho-cuerpo basal obtenido a partir de esta cepa (abajo). Barra de escala: 500 nm para las células y 50 nm para los filamento-gancho-cuerpo basal (Modificado de: de la Mora *et al.*, 2015).

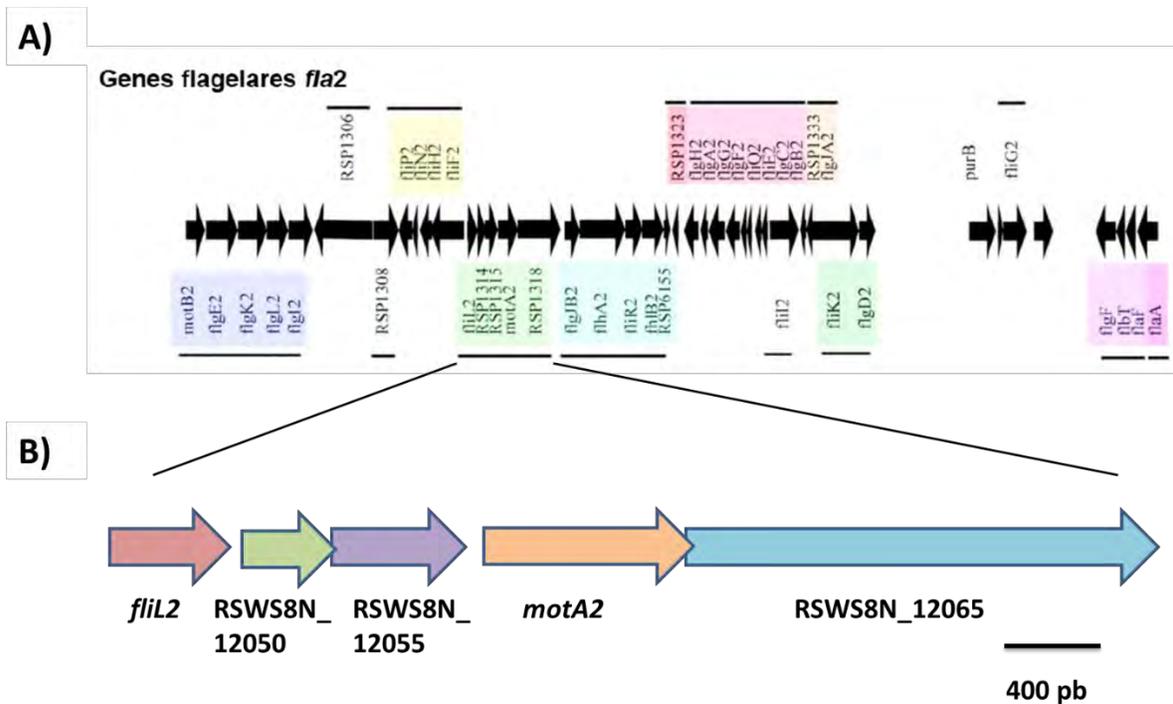
La cepa AM1 que expresa *fla2* se aisló como una supresora a partir de una mutante en el regulador maestro de *fla1* ( $\Delta fleQ::Kan^r$ ) (del Campo *et al.*, 2007). Para identificar la naturaleza de la mutación supresora se secuenció el genoma de AM1 y se estableció que una mutación permite la expresión de *fla2*. Una mutación puntual en CckA (L391F) es la que le confiere el fenotipo de nado a AM1, a través de un sistema de dos componentes. CckA es una histidín cinasa y la mutación L391F se encuentra en el dominio de histidín cinasa, a tan sólo 5 residuos del residuo H397 necesario para la fosforilación. *In vitro*, esta versión mutante es capaz de autofosforilarse con mayor eficiencia que la versión silvestre de CckA, lo que sugiere que esta mutación genera una ganancia en la función de CckA, que lleva a encender la expresión de *fla2* (Vega-Baray *et al.*, 2015).

El sistema de dos componentes conformado por CckA, ChpT y CtrA se encuentra

altamente conservado en las  $\alpha$ -proteobacterias. Ccka es una histidín cinasa híbrida, pues además del dominio de histidín cinasa posee un dominio REC, el cual usualmente se encuentra en el regulador de respuesta. Por su parte, ChpT funciona como histidín fosfotransferasa mientras que CtrA es el regulador de respuesta, que se une al ADN y provoca la activación o represión de sus genes blanco. Se ha demostrado que CtrA controla diversos procesos celulares que van desde replicación, división celular, la formación de biopelícula, la formación de la partícula GTA (del inglés, *Gene Transfer Agent*), proteínas quimiotácticas y la motilidad (Lang y Beatty, 2002; Laub *et al.*, 2002; Zan *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Francez-Charlot *et al.*, 2015; Vega-Baray, *et al.*, 2015; Hernandez-Valle *et al.*, 2017).

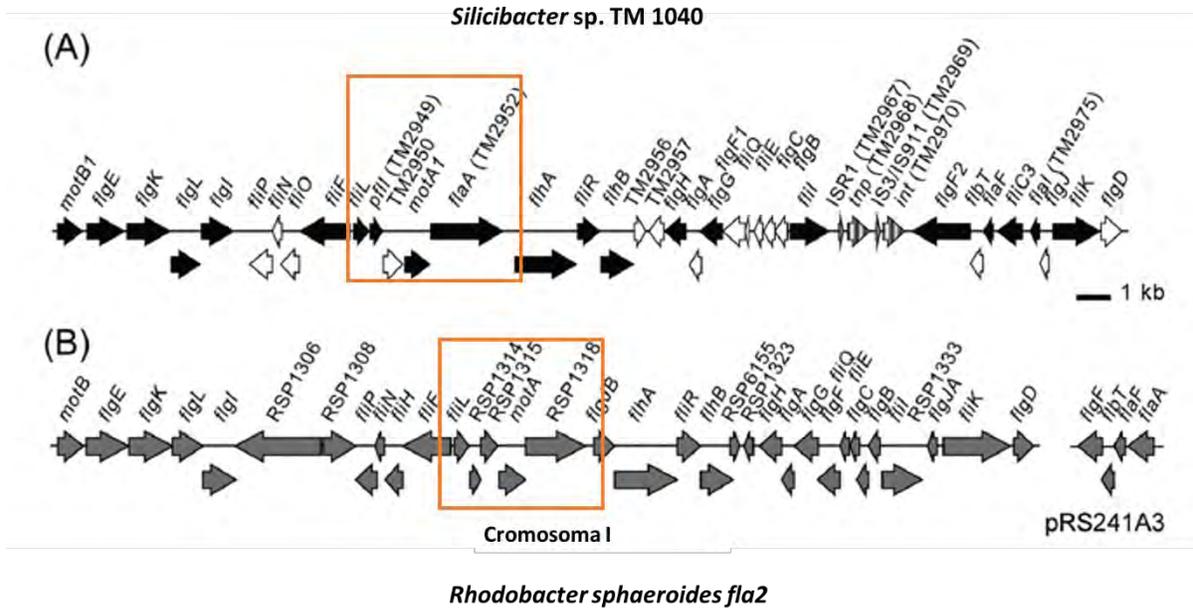
Se desconocen las condiciones que naturalmente permiten la expresión de *fla2* en la cepa WS8N, sin embargo, se sabe que los ácidos orgánicos tricarbóxicos controlan negativamente la expresión de CckA y por lo tanto, de *fla2* (Vega-Baray, *et al.*, 2015).

A pesar de que varios de los genes de *fla2* codifican para homólogos de función conocida, existen otros marcos de lectura abiertos presentes en este *locus* flagelar cuya función se desconoce. Uno de ellos es RSWS8N\_12065, el cual se encuentra en un operón putativo con otros cuatro genes más, que son: *fliL2*, *motA2* y otros dos marcos de lectura abiertos de función desconocida (Fig. 18).



**Figura 18.** Organización genética de *fla2*. A) Se muestra el conjunto de los genes flagelares correspondientes a *fla2*. Las flechas indican la dirección de la transcripción y los colores y líneas negras representan la posible organización de los operones. La anotación utilizada corresponde a la de la *R. sphaeroides* 2.4.1. B) Se muestra el arreglo genético del operón putativo que contiene a RSWS8N\_12065, el homólogo en la cepa 2.4.1. es RSP\_1318 (Modificado de Poggio et al., 2007).

Se ha reportado que *Silicibacter* sp., una  $\alpha$ -proteobacteria que pertenece a la familia *Rhodobacteraceae*, tiene un arreglo del *locus* flagelar muy parecido al de *fla2* de *R. sphaeroides* (Fig. 19) (Poggio et al., 2007; Belas et al, 2009). En un operón putativo que contiene a *fliL* y *motA*, se encuentra un marco de lectura abierto llamado *flaA* (Miller y Belas, 2006), una mutante en este gen tiene fenotipo Mot<sup>-</sup>, es decir, tiene flagelos pero no es mótil (Belas et al., 2009). *flaA* es el homólogo a RSWS8N\_12065, pero su función es desconocida, sin embargo, se ha sugerido que de acuerdo al contexto genético en el que se encuentra, podría participar en la biosíntesis flagelar o en la exportación (Miller y Belas, 2006).



**Figura 19.** Organización genética de los sistemas flagelares de A) *S. sp.* TM1040 y B) el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*. La anotación utilizada corresponde a la de la *R. sphaeroides* 2.4.1. Con un cuadro anaranjado, se muestra el operón putativo que contiene a RSWS8N\_12065(RSP\_1318) en *R. sphaeroides* o *flaA* en *S. sp.* TM1040 (Modificado de Belas et al., 2009).

### **Objetivo general**

- Determinar la participación de la proteína codificada por el marco de lectura abierto RSWS8N\_12065, en el funcionamiento del sistema flagelar 2 (Fla2) de *Rhodobacter sphaeroides*.

### **Objetivos particulares**

- Determinar el fenotipo de una mutante en el marco de lectura abierto RSWS8N\_12065, sobre el fondo genético de AM1.
- Determinar la localización de la proteína codificada por el marco de lectura abierto RSWS8N\_12065 en la célula.
- Determinar la interacción de la proteína codificada por el marco de lectura abierto RSWS8N\_12065 con otras proteínas de Fla2.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

En la tabla 1 se muestran las cepas y plásmidos usados en este trabajo.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido	Características <sup>1</sup>	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>araA-leu</i> )7697 <i>galU galK</i> <i>rsp LendA1 nupG</i>	Invitrogen
S17	<i>recA endA thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu- Km::Tn7;	Simon <i>et al.</i> , 1983.
LGM194	F <sup>-</sup> Δ <i>lacX74 gal E thi rpsL</i> Δ <i>phoA</i> (Pvu II) Δ <i>ara714 leu</i> ::Tn10	Invitrogen
<i>R. sphaeroides</i>		
AM1	Δ <i>fleQ</i> ::Kan <i>cckA</i> <sub>L391F</sub> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup>	del Campo <i>et al.</i> , 2007.
IM1	AM1 <i>motK</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	Este trabajo
IM2	AM1 Δ <i>motK</i> :: <i>hgo</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Hgo <sup>r</sup>	Este trabajo
IM3	AM1 Δ <i>motK</i> :: <i>hgo motB2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Hgo <sup>r</sup>	Este trabajo
IM4	AM1 Δ <i>motK</i> :: <i>hgo motA2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Hgo <sup>r</sup>	Este trabajo
IM5	AM1 Δ <i>motK</i> :: <i>hgo fliL2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Hgo <sup>r</sup>	Este trabajo
IM6	AM1 <i>motB2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	Este trabajo
IM7	AM1 <i>motA2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	Este trabajo
IM8	AM1 <i>fliL2</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	Este trabajo
EA1	AM1 Δ <i>ctrA</i> :: <i>aadA</i> ; Kan <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	Vega-Baray <i>et al.</i> , 2015.
Plásmidos		
pRK415	Derivado de pRK404; Tc <sup>r</sup>	Keen <i>et al.</i> , 1988.
pRK_ <i>motK</i>	Derivado de pRK415, contiene <i>motK</i> ; Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pRK_ <i>motK-sfGFP</i>	Derivado de pRK415, contiene <i>motK</i> fusionado a <i>sfGFP</i> ; Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pJQ200mp18	Vector suicida; Gm <sup>r</sup>	Quandt y Hynes, 1993.

pBADHisA o pBADHisB	Vector de sobreexpresión con etiqueta de histidinas (6x) en el extremo amino; Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pBADHisA_ <i>motK</i>	Derivado de pBADHisA, contiene <i>motK</i> sin secuencia señal; Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pBADHisB_ <i>motB2p</i>	Derivado de pBADHisB, contiene la región periplásmica de <i>motB2</i> ; Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pTZ18R	Vector de clonación, derivado de pUC; Amp <sup>r</sup>	Pharmacia
pPIRL	Vector que codifica ARN <sub>t</sub> para codones raros (Pro, Ile, Arg y Leu); Cm <sup>r</sup>	Bao y Cohen, 2001.
pTB263	Vector que contiene a <i>sfGFP</i> ; Amp <sup>r</sup>	Uehara <i>et al.</i> , 2009.

<sup>1</sup>Amp: ampicilina; Cm: cloranfenicol; Gm: gentamicina; Hgo: higromicina; Kan: kanamicina; Nal: ácido nalidíxico; Spc: espectinomina; Tc: tetraciclina.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (Bertani, 1951) a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Cuando fue requerido se utilizaron antibióticos en las siguientes concentraciones: Tc 25 µg/mL, Amp 200 µg/mL, Cm 34 µg/mL, Spc 50 µg/mL, Nal 20 µg/mL y Gm 30 µg/mL.

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron en medio Sistrom a 30°C en iluminación constante (Sistrom, 1962); sin embargo, para algunos protocolos este medio se modificó: - Sux, medio Sistrom sin ácido succínico ni casaminoácidos. Cuando fue necesario se utilizaron antibióticos en las concentraciones que se indican a continuación: Nal 20 µg/mL, Kan 25 µg/mL, Hgo 100 µg/mL en medio sólido o 50 µg/mL en medio líquido, Spc 50 µg/mL y Tc 1 µg/mL.

### Reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase chain reaction* (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima Native Pfu DNA Polymerase de Stratagene. Para las diferentes amplificaciones, se utilizaron los oligonucleótidos mencionados en la tabla 2.

El termociclador se programó con las siguientes condiciones 94°C 2 minutos, posteriormente 3 ciclos de 94°C 2 minutos, 55°C 45 segundos, 72°C (1-2 minutos por kb), después 30 ciclos de 94°C 2 minutos, 58°C 45 segundos, 72°C (1-2 minutos por kb) y por último 72°C 10 minutos. El resultado de las amplificaciones fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa 1%.

La secuenciación de los productos se realizó con un secuenciador automático ABI PRISM 310 de Perkin Applied Biosystems en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
FW-1318HindIII	5' - CCCAAGCTTCAACATGTGCATCGAGGTCGGAC - 3'
REV-1318XbaI	5' - GATCTCTAGAGCGCTGAACATGGGCGTGCATAG - 3'
REV1318Sma-S/Stop	5'- AGGCCCCGGGACCGTCGGGCGGTTGTTTCGCCGCC-3'
FW-sfGFP-Sma S/ATG	5'- TCCCCCGGGTCTAAAGGTGAAGAACTGTTACCC-3'
REV-sfGFP EcoRI	5'- CCGGAATTCTTATTAGGATCCGCCAGCACCTTT-3'
FW-1318Sac-pQE30	5'- AAAGAGCTCGCCGAGGCTGCCGTGCGAACGGGC -3'
REV1318Hind-pQE30	5'- CCCAAGCTTCTAACCGTCGGGCGGTTGTTTCGCC-3'
mot B2 Xba Fw	5'- CTAGTCTAGAGAACTGGTTCGCGCTCGCGGAG -3
mot B2 Eco Rev	5'- CCGGAATTCCGTCATGGAAAGCGCCTTTC-3
mot A2 Xba Fw	5'- CTAGTCTAGAGCGTCCTTCTTGCCGGCCGGAATG -3
mot A2 Eco Rev	5'- CCGGAATTTCGTGAAGCCCGGATGCTCGCCCC -3
FwdHindIIIFliL2	5'- CCCAAGCTTACACGGGCTTCTGCCTTGCCC-3'
RvrSmaIFliL2	5'- AGGCCCCGGGAGAAGCGCTTCAGCCTCTGGC-3'
FwKpnMotB2p	5'- CGGGGTACCACGACGGAGAAACAGCGCAAG-3'
RvHindMotB2pstop	5'- CCCAAGCTTTCAGCGGTCGCGGCGCAGGAG-3'

### Digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones de los plásmidos o fragmentos de ADN a clonar se realizaron utilizando enzimas de restricción de New England Biolabs (NEB) o Promega siguiendo las instrucciones del proveedor.

### Reacción de ligación

Estas reacciones se realizaron en una relación molar 1:3 vector-inserto utilizando T4 DNA Ligase de NEB. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche o 24°C durante 15 minutos.

## **Purificación de plásmido**

Para la purificación de plásmido se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del proveedor.

## **Clonación de *motK* y *motB2* para sobreexpresión**

Para el caso de la sobreexpresión de proteína, se utilizó MotK sin secuencia señal, para ello se utilizaron los oligonucleótidos FW-1318Sac-pQE30 y REV1318Hind-pQE30 (Tabla 2) para amplificar a partir del ADN genómico de *R. sphaeroides* WS8N. El producto de PCR se clonó en el vector de sobreexpresión pBADHisA. Mientras que la región periplásmica de MotB2 (MotB2p) se amplificó a partir del ADN genómico de *R. sphaeroides* WS8N, con el uso de los oligonucleótidos FwKpnMotB2p y RvHindMotB2pstop (Tabla 2). El fragmento de ADN se clonó en pBADHisB. Ambos vectores añaden una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino de la proteína de interés.

## **Aislamiento de las mutantes en *motK*, *motB2*, *motA2* y *fliL2***

Se amplificaron mediante PCR los genes correspondientes de *motK*, *motB2*, *motA2* y *fliL2* a partir del genoma de *R. sphaeroides* WS8N, para ello se utilizaron los oligonucleótidos FW-1318HindIII y REV-1318XbaI para *motK*, mot B2 Xba Fw y mot B2 Eco Rev para *motB2*, mot A2 Xba Fw y mot A2 Eco Rev para *motA2* y, FwdHindIIIFliL2 y RvrSmaIFliL2 para *fliL2* (Ver tabla 2). En todos los casos, se amplificó 100 pb río arriba del inicio de la traducción y 100 pb río abajo del final de la traducción. Los productos de PCR *motK* (2,163 pb), *motB2* (1,037 pb), *motA2* (1,070 pb) y *fliL2* (689 pb) se clonaron, por separado, en el plásmido de clonación pTZ18R. Posteriormente, se insertó un casete de resistencia a espectinomicina en un sitio único de cada una de las secuencias: *motK* (HincII, localizado a 709 pb del codón de inicio), *motB2* (BglII, localizado a 488 pb del codón de inicio), *motA2* (XhoII, localizado a 292 pb del codón de inicio) y *fliL2* (XhoI, localizado a 274 pb del codón de inicio). Este casete no contiene terminadores de la transcripción para evitar efectos polares, sin embargo, en las construcciones interrumpidas se determinó la orientación del casete de resistencia. Una vez confirmada la orientación correcta, las construcciones con los genes interrumpidos se subclonaron en el vector suicida pJQ200mp18 (Ver tabla 1) y mediante conjugación biparental se introdujeron las versiones mutantes de los

genes en la cepa AM1 de *R. sphaeroides* para las mutantes sencillas y *motB2::aadA*, *motA2::aadA* y *fliL2::aadA* en la cepa IM2 ( $\Delta$ *motK::hgo*) para las mutantes dobles.

Para la construcción de la mutante  $\Delta$ *motK::hgo*, se utilizó *motK* presente en pTZ18R, mencionada previamente. Se digirió con ClaI y EcoRV, con lo cual la mayor parte de la secuencia clonada se perdió, conservando únicamente 804 pb de las 2163 pb clonadas inicialmente. Posteriormente se insertó un casete de resistencia a higromicina utilizando los sitios de ClaI y EcoRV para dirigir el casete en la orientación correcta, para evitar posibles efectos polares. Esta construcción,  $\Delta$ *motK::hgo*, se subclonó en pJQ200mp18 y se introdujo en la cepa AM1 de *R. sphaeroides* a través de una conjugación biparental.

Las transconjugantes se seleccionaron con base en su resistencia a espectinomicina o higromicina, según fuera el caso y, sensibilidad a gentamicina.

### **Complementación de las cepas mutantes**

Para complementar a las mutantes sencillas, los fragmentos de *motK*, *motA2*, *motB2* y *fliL2*, utilizados para las construcciones de las mutantes, se clonaron en el vector pRK415. Estas construcciones se introdujeron por conjugación en las respectivas cepas mutantes, y las exconjugantes se seleccionaron por su resistencia a tetraciclina.

### **Ensayos de nado en placas de agar suave**

Los ensayos de nado, se realizaron en -Sux adicionado con 100  $\mu$ M de succinato de sodio. Estos ensayos se llevaron a cabo en agar suave, con una concentración de 0.25% de agar. Las placas se inocularon a partir de un cultivo en fase estacionaria y se incubaron a 30°C durante 48 horas.

### **Conjugación biparental**

Esta técnica se modificó de una previamente reportada (Davis *et al.*, 1988). Se creció a las cepas *E. coli* S17 (donadora) y *R. sphaeroides* (receptora) hasta la fase exponencial. Posteriormente se tomaron 500  $\mu$ L cada cepa y se centrifugaron a 3,000 x *g* durante 5 minutos. Se lavaron las células con 500  $\mu$ L de LB en tres ocasiones, en el último lavado se retiró todo el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió la pastilla de células en 30  $\mu$ L de LB. Las células se colocaron en una membrana de nitrocelulosa colocada en una caja

de LB y se incubó a 30°C toda la noche. Al día siguiente, se colocó la membrana en un tubo eppendorf estéril y se agregaron 500 µL de LB. Posteriormente, se agitó el tubo en un vórtex para desprender las células de la membrana de nitrocelulosa y estas se plaquearon en medio selectivo, con el fin de obtener las transconjugantes de *R. sphaeroides*.

### **Competencia y transformación en *E. coli***

Estas técnicas se realizaron mediante una modificación de un protocolo previamente reportado (Cohen *et al.*, 1972). Para la competencia, se creció a la cepa de interés hasta una DO<sub>600 nm</sub>: 0.5 unidades de absorbancia. Se incubó 10 minutos en hielo, posteriormente se cosechó el cultivo a 3,500 x g 5 minutos a 4°C, la pastilla se resuspendió suavemente en ½ del volumen inicial con CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se incubó durante 15 minutos en hielo. Después, se centrifugó el cultivo a 3,500 x g durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente en 1/15 del volumen inicial del cultivo, con CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Estas células se incubaron de 1 a 24 horas en hielo.

Las células competentes se incubaron con el ADN de interés en hielo durante 1 h. Posteriormente, se les aplicó un choque de calor a 42°C y se incubaron 2 minutos en hielo. Después, se añadieron 800 µL de LB y se incubaron las células a 37°C 1 hora. Por último, las células se plaquearon en medios selectivos.

### **Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante**

#### MotK recombinante soluble

Se inoculó 1 L de medio LB con *E. coli* LMG194 pBADHisA<sub>motK</sub> pPIRL y se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600 nm</sub>: 0.5 unidades de absorbancia. En esta fase del cultivo, se hizo la inducción con 0.002% de L-arabinosa. Este cultivo se incubó durante 3 h a 37°C y, posteriormente, se centrifugó a 6,300 x g, 15 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 20 mL de amortiguador Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, lisozima 1 mg/mL, 2 pastillas inhibitoras de proteasas (cOmplete EDTA-free de Roche), imidazol 10 mM, pH 8 y se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se sonicó 6 veces durante 1 minuto, en hielo. El extracto crudo se centrifugó a 12,000 x g 10 minutos a 4°C y después se ultracentrifugó a 108,500 x g durante 1h a 4°C, después se recuperó el sobrenadante y se incubó, en agitación suave, con 300 µL de resina de agarosa Níquel ácido nitrilo triacético o Ni-NTA (del inglés,

*Nickel-Nitrilo Triacetic Acid*) de QIAGEN durante 2 horas. Posteriormente se purificó la proteína, para ello, se lavó la resina con amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 con diferentes concentraciones de imidazol.

#### MotK recombinante en condiciones desnaturalizantes

Se inoculó 1 L de medio LB con *E. coli* LMG194 pBADHisA\_ *motK* pPIRL y se incubó a 37°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ : 0.5 unidades de absorbancia. En esta fase del cultivo, se hizo la inducción con 0.002% de L-arabinosa. Este cultivo se incubó durante 3 h a 37°C y se cosechó a 6,300 x g 15 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 20 mL de amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, Guanidina-HCl 6M, pH 8. Posteriormente, se sonicó 5 veces durante 1 minuto, en hielo. El extracto crudo se ultracentrifugó a 180,569 x g durante 1h a 4°C, después se recuperó el sobrenadante y se incubó, en agitación suave, con 200  $\mu\text{L}$  de resina de agarosa Níquel ácido nitrilo triacético o Ni-NTA (del inglés, *Nickel-Nitrilo Triacetic Acid*) (QIAGEN) toda la noche. Posteriormente se procedió a realizar la purificación de la proteína, para ello se lavó la resina con amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, Guanidina-HCl 6M, pH 8 con imidazol en diferentes concentraciones.

#### MotB2p recombinante

Se inocularon 100 mL de LB con *E. coli* LMG4 pBADHisB\_ *motB2p* y se incubó a 37°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ : 0.600 unidades de absorbancia. Posteriormente se indujo con 0.2% de L-arabinosa y se incubó a 37°C durante 2 h. Después, se centrifugó a 5,500 x g 15 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 10mL de amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, 1 pastilla inhibidora de proteasas (cOmplete EDTA-free de Roche), pH 8. Se sonicó 6 veces durante 1 minuto, en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g 10 minutos a 4°C y después se ultracentrifugó a 108,500 x g durante 1h a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con 200  $\mu\text{L}$  de resina Níquel ácido nitrilo triacético o Ni-NTA (del inglés, *Nickel-Nitrilo Triacetic Acid*) (QIAGEN) durante 1 h a 4°C en agitación suave. Se realizaron los lavados de la resina con amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 con diferentes concentraciones de imidazol.

El resultado de las purificaciones se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12.5%. Cuando se necesitó, se cuantificó la concentración de

proteína por el método de TCA-Lowry (del inglés, *Trichloroacetic acid*) (Peterson, 1977).

### **Generación de anticuerpos policlonales contra MotK**

Para poder generar anticuerpos contra las proteínas recombinantes, se utilizaron conejos macho *New Zeland*.

Los anticuerpos se generaron contra MotK recombinante purificada en condiciones desnaturalizantes, el protocolo de inmunización se realizó de la siguiente forma: Se hizo una electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida 10%, con un grosor 1mm, de la proteína MotK purificada en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se tiñió el gel con azul de coomassie durante 15 minutos, y cortó la banda que correspondía a la proteína recombinante. Después se destiñió con metanol 50%, ácido acético 10% hasta que la banda se volvió transparente. Se lavó la banda con Tricina-KOH, PMSF (del inglés, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*) 1 mM pH 7.8 durante 1 h con varios cambios de la solución mencionada. Posteriormente se trituró la banda con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Este polvo se resuspendió en un volumen final de 800µL de PBS (del inglés, *Phosphate-buffered saline*; NaCl 137 mM, KCl 2.7 Mm, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4) y se mezcló con vórtex hasta que la muestra no tuviera consistencia viscosa. Esta muestra se utilizó para inocular al conejo de forma subcutánea.

Se realizaron dos sangrados, el primero un mes y medio después de la primera exposición al antígeno, y el segundo dos meses y medio después. Se evaluó la especificidad de la mezcla de los anticuerpos policlonales mediante *western-blot*. Cuando se requirió, se precipitaron los anticuerpos utilizando sulfato de amonio para poder obtener gamma globulinas, como se ha reportado previamente (Harlow y Lane, 1988).

### **Ensayo de interacción proteína-proteína: Coimmunoprecipitación**

En tubos eppendorf de 1.5 mL se agregaron 20 µL de resina acopladas a la proteína A y se les agregó 1 µL (7 µg) de gamma globulinas anti-MotK, se incubaron en 1 mL de amortiguador Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 a 4°C en agitación suave durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron a 9,700 x g por 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se mantuvieron en hielo. Simultáneamente, se pusieron a incubar las proteínas a interactuar, así como los respectivos controles en una concentración de 0.07 µM en

amortiguador Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8 durante 1 h a 4°C en agitación suave. Cabe mencionar que, para el caso de MotK, no fue posible obtener una purificación más limpia, así que se decidió estimar el porcentaje que representa la banda de MotK con respecto a todas las demás bandas que se observan en la elución y, así poder estimar la concentración de MotK presente en solución. Posteriormente, se centrifugó a 19,000 x g por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Este sobrenadante se incubó con la resina ya acoplada a anti-MotK y se incubaron durante 1 h a 4°C en agitación suave. Después se realizaron dos lavados centrifugando a 3,500 x g por 6 minutos a 4°C y lavando con 1 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8. En el último lavado, se retiró la mayor parte del sobrenadante, dejando un volumen de aproximadamente 20 µL, a éste se le agregaron 20 µL de amortiguador de carga 1x y se hirvió durante 10 minutos.

El resultado se analizó mediante *western-blot* utilizando un anticuerpo anti-histidinas (Pierce chemicals), para ello se hizo una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12.5%.

### **Localización de MotK**

Se hizo una fusión de la proteína de interés, MotK, con una variante de la proteína verde fluorescente, la superfolder GFP (sfGFP) (Pédelacq *et al.*, 2006), con el fin de poder determinar la localización de MotK en la célula. Para ello, se usaron los oligonucleótidos FW-1318HindIII y REV1318Sma-S/Stop (Tabla 2) para amplificar a *motK*, a partir del genoma de *R. sphaeroides* WS8N. El producto de PCR contiene 100 pb río arriba del codón de inicio y carece de codón de término. Por otra parte, se amplificó a *sfGFP* con el uso de los oligonucleótidos FW-sfGFP-Sma S/ATG y REV-sfGFP EcoRI (Tabla 2), como ADN templado se utilizó el vector pTB263. Este fragmento carece de codón de inicio.

Posteriormente el fragmento *motK* se clonó en el vector pTZ18R y, río abajo se clonó el producto de PCR *sfGFP*. Estos fragmentos fusionados se subclonaron en el vector pRK415 y esta construcción se introdujo en *R. sphaeroides* mediante conjugación (Davis *et al.*, 1988).

Para los ensayos de localización de MotK, se crecieron a las cepas de interés en 1.5 mL de medio Sistro a 30°C en iluminación constante durante toda la noche y se diluyó 1:100 en -Sux complementado con casaminoácidos 0.02%, MgCl<sub>2</sub> 20 Mm, este subcultivo

se creció durante 16-21 h a 30°C, 250 rpm en condiciones aeróbicas y, se verificó el nado de las cepas mediante microscopía de campo oscuro de alta intensidad. Después, se montó la muestra en una cama de agarosa al 1.2% para observarla por microscopía de epifluorescencia. El tiempo de exposición utilizado fue de 2 a 3 s.

### **Inmunodetección de MotK**

Para la inmunodetección de MotK, se creció un cultivo de AM1 e IM1 en 1.5 mL de medio Sistro a 30°C en iluminación constante durante toda la noche que se diluyó 1:100 en 10 mL de -Sux con casaminoácidos 0.2%, MgCl<sub>2</sub> 20 mM y se incubó a 30°C 250 rpm en condiciones aeróbicas durante 16-21 h. Mientras que para la inmunodetección de MotK-sfGFP, se crecieron las cepas AM1 e IM1 pRK\_*motK-sfGFP* en 1.5 mL a 30°C en iluminación constante durante toda la noche y se diluyeron 1:100 en 15 mL de -Sux, el cultivo se incubó a 30°C en condiciones anaeróbicas durante 20 h. En ambos casos, se examinó el nado mediante microscopía de campo oscuro de alta intensidad. Entonces, el cultivo se cosechó a 16,000 x g, se concentró 20 veces en amortiguador de carga 1x y se hirvieron las muestras durante 7 minutos.

Se separaron por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 8.5% 20 µg de los extractos totales y se analizaron mediante *western-blot* utilizando gamma globulinas α-MotK a una dilución de 1:1,000.

### **Aislamiento de filamento-gancho-cuerpo basal**

Con el fin de aislar las estructuras filamento-gancho-cuerpo basal (FGCB) de la mutante *motK::aadA*, la cepa se creció en 2 ml de medio Sistro 30°C, 250 rpm en condiciones aeróbicas durante toda la noche. Este cultivo se diluyó 1:250 en 500 mL de medio -Sux con casaminoácidos 0.2% que se incubó durante 16 h a 30°C 250 rpm en condiciones aeróbicas. El cultivo se centrifugó a 3,900 x g a 4°C 20 minutos, la pastilla se resuspendió con agitación suave en 10 mL de amortiguador Tris-HCl 150 mM, sacarosa 500 mM, pH 8. Este cultivo se mantuvo en agitación suave en hielo, posteriormente se añadieron 100 µL lisozima 1 mg/mL y 1 mL de EDTA 20 mM y se dejó incubando aproximadamente durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 1 mL de Tritón X-100 10% y se incubó durante 3 minutos; a continuación, se añadieron 600 µL de MgSO<sub>4</sub> 100 mM y 1

mg de DNAsa. Posteriormente, se agregaron 10 mL de Tris-HCl 150 mM sacarosa 500 mM, pH 8 y se centrifugó a 9,700 x g por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 108,500 x g durante 1 h a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 400 µL de amortiguador Tris-HCl 10 mM, EDTA (del inglés, *Ethylenediaminetetra acetic acid*) 1 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 8 (de la Mora *et al.*, 2017).

Las estructuras obtenidas, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y, se observaron por microscopía electrónica de transmisión.

### **Rasurado del filamento de las células (*Shearing*)**

Para poder determinar el fenotipo de la mutante sencilla en *fliL2* se hizo un rasurado, por medio del cual se analizó la presencia de la proteína del filamento después de un severo tratamiento mecánico. Para ello, se creció un cultivo de AM1 y *fliL2::aadA* en 1.5 mL de medio Sistro a 30°C en iluminación constante durante toda la noche, el cual se diluyó 1:100 en 10 mL de medio -Sux con casaminoácidos 0.2% con MgCl<sub>2</sub> 20 Mm y se incubó durante 19-21 h a 30°C a 250 rpm en condiciones aeróbicas. Se tomó 1 mL como control para el extracto celular, el resto del cultivo se cosechó a 8,100 x g durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 1 mL de HEPES 10 mM pH 7.2 y se pasó 140 veces por una jeringa de insulina, se verificó que las células perdieran la motilidad. Posteriormente, se centrifugó a 16,000 x g 1 min, del sobrenadante recuperado se tomaron 100 µL y se le agregó 25 µL de amortiguador de carga 4x. La pastilla se resuspendió en 100 µL de amortiguador de carga 4x. Las muestras se hirvieron a 90°C durante 10 min.

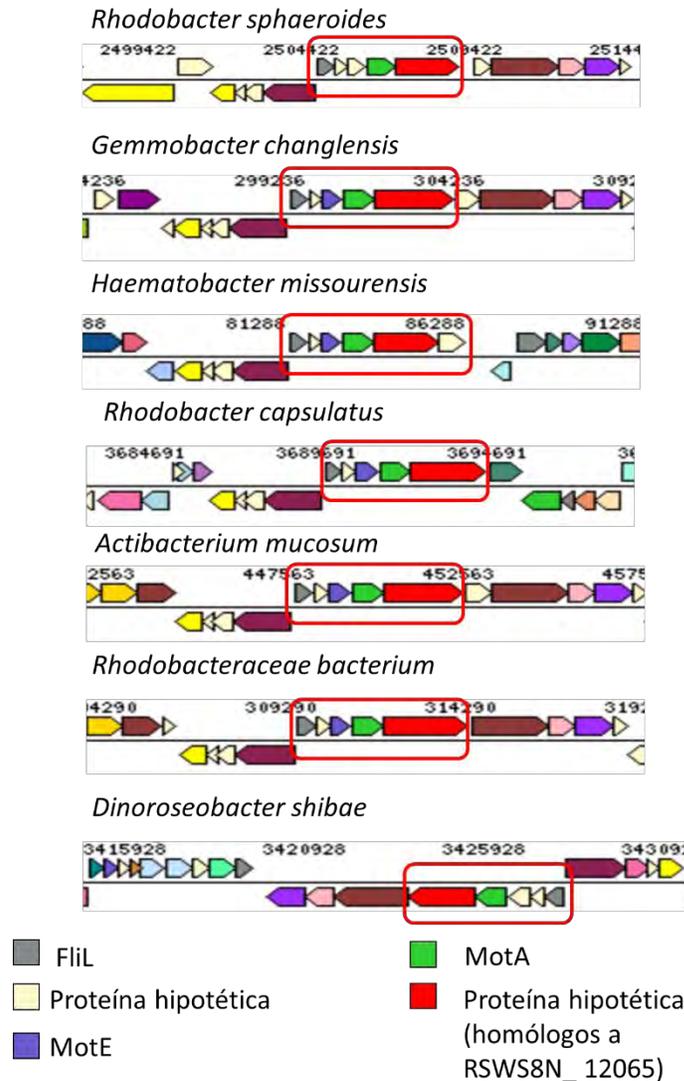
## Resultados

### Análisis bioinformático de la secuencia RSWS8N\_12065

Como primer paso para determinar la posible función de la proteína codificada por el marco de lectura abierto RSWS8N\_12065, se realizaron varios análisis bioinformáticos. En primer lugar, se realizó un DELTA-BLAST con el fin de encontrar un homólogo a la proteína codificada por RSWS8N\_12065, sin embargo, todos los homólogos que se encontraron están anotados como proteínas hipotéticas.

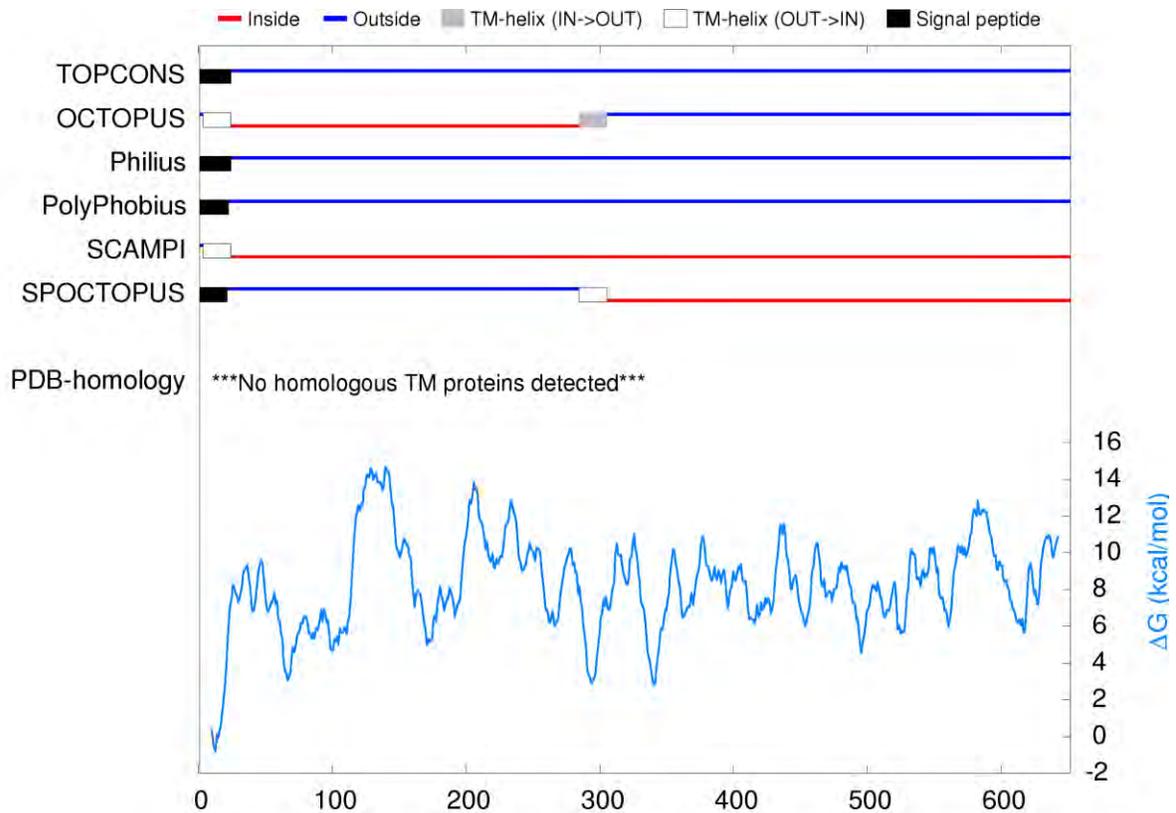
Las secuencias homólogas a RSWS8N\_12065 se encontraron únicamente en la familia *Rhodobacteraceae*. Al analizar con más detalle el arreglo genético en el que se encuentran estos homólogos, se encontró que el contexto genómico es muy similar al arreglo del operón putativo en el que se encuentra RSWS8N\_12065 (Fig. 20), es decir, está conservado en la familia *Rhodobacteraceae*. En todos los casos, los operones putativos comienzan con FliL, proteína asociada al motor del flagelo de la cual su función es diferente de acuerdo a la especie, y se ha relacionado con el nado en enjambre (del inglés, *swarming*) o la rotación del flagelo a través de la interacción con el estator (Attmannspacher *et al.*, 2008; Suaste-Olmos *et al.*, 2010; Partridge *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015). Río abajo de FliL se encuentran una o dos proteínas hipotéticas, en algunos organismos una de estas proteínas se encuentra anotada como MotE y sólo está presente únicamente en algunas  $\alpha$ -proteobacterias y funge como chaperona de MotC (Eggenhofer *et al.*, 2004), la cual ejerce control sobre la velocidad del flagelo en *Sinorhizobium meliloti* (Platzer *et al.*, 1997). Después se encuentra MotA, proteína que junto con MotB conforman el estator. Y por último, se encuentran los homólogos a RSWS8N\_12065, ninguno está caracterizado funcionalmente. Todos ellos poseen una longitud variable que va desde aproximadamente 600 a 800 aminoácidos. En el caso de *R. sphaeroides*, los últimos cuatro nucleótidos de *motA2* corresponden a los primeros cuatro de RSWS8N\_12065, lo que sugiere un acoplamiento transcripcional entre ambos.

También cabe señalar que, en algunos organismos, el gen río abajo de los homólogos de RSWS8N\_12065, que codifica para la enzima lítica flagelar, pareciera formar parte del operón.



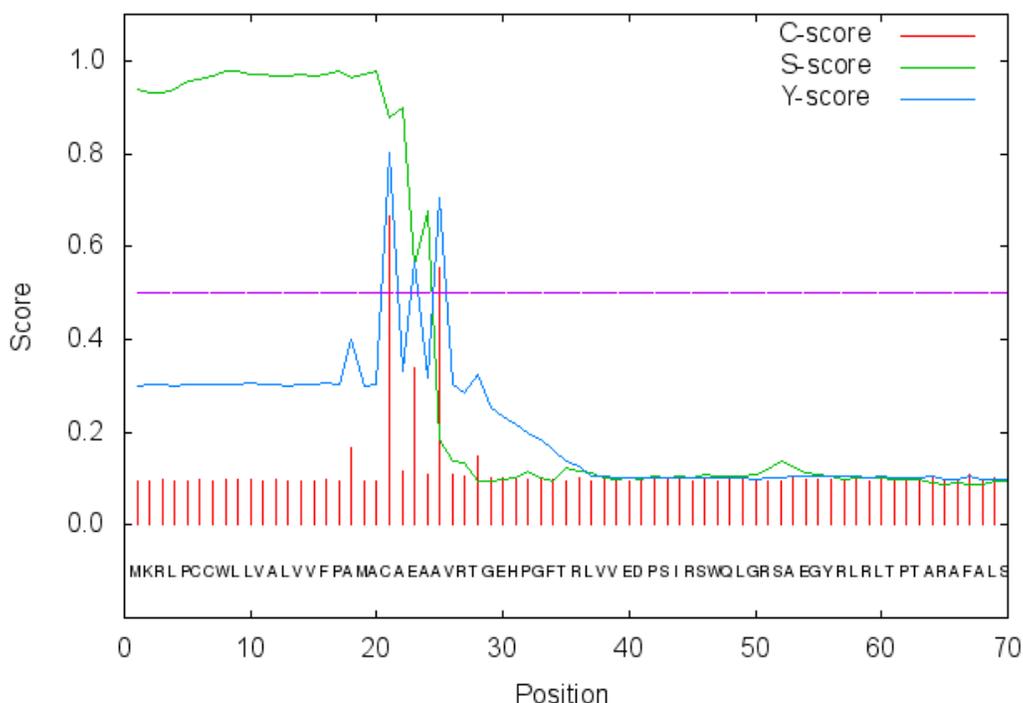
**Figura 20.** Arreglo genético de los operones que contienen genes homólogos a RSWS8N\_12065. Se utilizó la base de datos IMG: *Integrated Microbial Genomes* (Markowitz *et al.*, 2012) para realizar una búsqueda de los homólogos de RSWS8N\_12065.

En el genoma de *R. sphaeroides* WS8N, la proteína que codifica RSWS8N\_12065 se está anotada como una proteína hipotética, por lo que se hizo una predicción de la topología de la proteína (Fig. 21). Los resultados arrojados por el servidor TOPCONS muestran diferentes topologías por los diferentes métodos utilizados por el programa. Sin embargo, en el resultado consenso (TOPCONS) y en otros métodos, se predice que la mayor parte de la proteína es extracelular. También cabe resaltar que al inicio de la secuencia se predice la presencia de un cruce transmembranal o secuencia señal.



**Figura 21.** Análisis de topología de la secuencia de la proteína codificada por RSWS8N\_12065. Este análisis se realizó con el servidor TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015).

Con el fin de discernir entre un cruce transmembranal o una secuencia señal, se usó el servidor SignalP. La predicción indica que la proteína posee una secuencia señal, con el sitio de corte más probable entre los aminoácidos 20 (Ala) y 21 (Cys) (Fig. 22). Esta secuencia la reconoce el sistema de secreción general (Sec). Estas secuencias se encuentran en el extremo amino y poseen una estructura tripartita (regiones n, h y c) que puede variar en longitud. La región n posee aminoácidos con cargas positivas. Seguida de la región h, que se caracteriza por ser hidrofóbica. Y por último se encuentra la región c que está compuesta principalmente por aminoácidos polares. En esta última región se encuentra el motivo de corte AXA para la peptidasa I (Natale *et al.*, 2008; Tsirigotaki *et al.*, 2017).

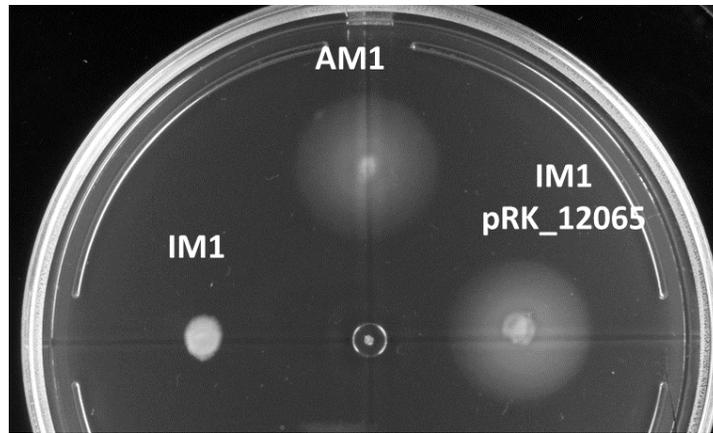


**Figura 22.** Predicción de secuencia señal de la proteína codificada por RSWS8N\_12065. Mediante el servidor SignalP (Petersen *et al.*, 2011) se realizó la predicción.

### Mutante en RSWS8N\_12065

Con el fin de establecer el papel del marco de lectura abierto RSWS8N\_12065 en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, se hizo una construcción en la cual se interrumpió RSWS8N\_12065 con un casete de resistencia a espectinomicina. Esta versión mutante, se integró al cromosoma de la cepa AM1 mediante un doble evento de recombinación. Una vez seleccionada la mutante, se evaluó el fenotipo mediante placas de nado en agar suave (Fig. 23). La mutación en este marco de lectura abierto mostró un fenotipo no mótil pues no se forma un halo de nado. También se observaron las células en el microscopio de alta intensidad de campo oscuro y se observó que las células no se desplazaban, confirmando el resultado obtenido en la placa de nado en agar suave. El fenotipo de nado se recuperó casi en su totalidad al complementar a la cepa mutante en RSWS8N\_12065 con una copia extra del gen en el vector pRK415 (Fig. 23).

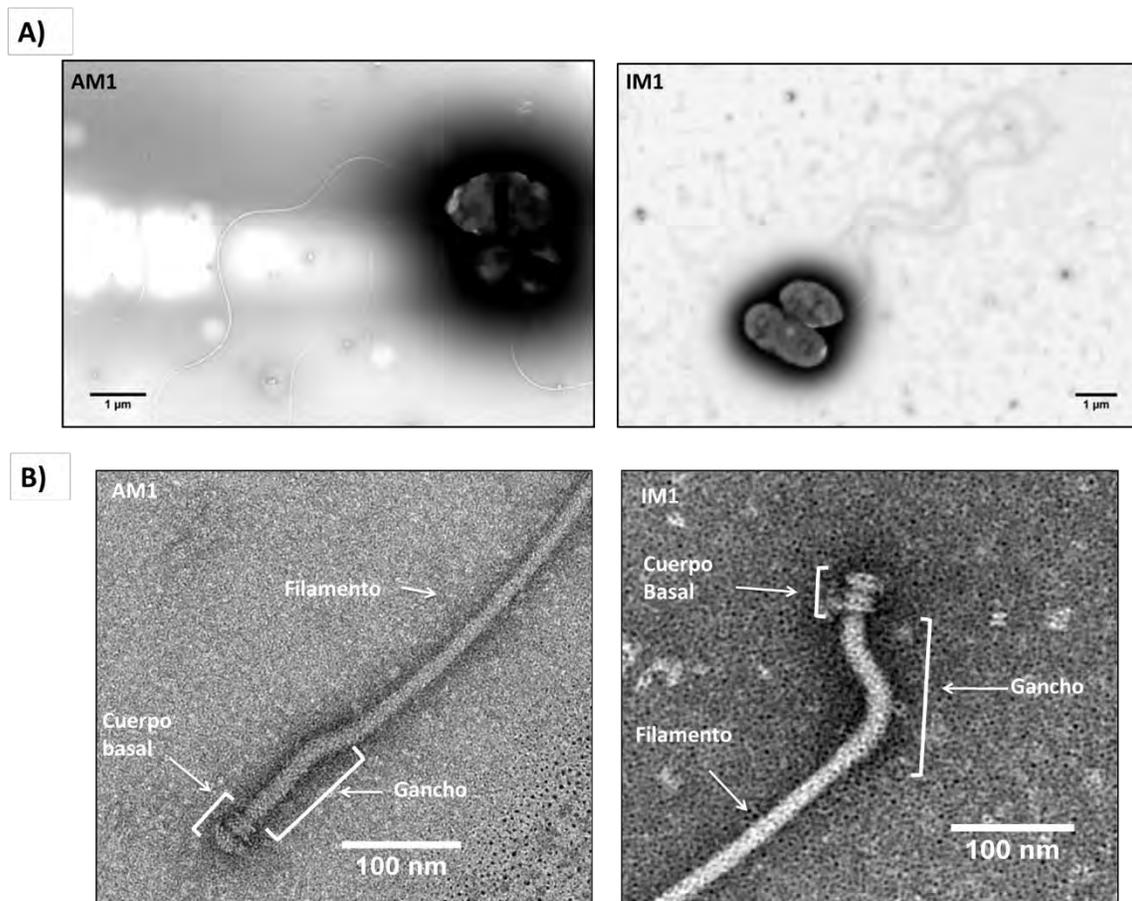
Por otra parte, se intentó aislar alguna supresora que pudiera ayudar a encontrar la función de esta proteína, sin embargo, no hubo éxito en la búsqueda.



**Figura 23.** Caracterización de la mutante interrumpida en RSWS8N\_12065. Se muestran los halos de nado de las cepas indicadas.

Para poder determinar el fenotipo de la mutante, es decir, si es  $Mot^-$  (células con flagelos pero paralizadas) o  $Fla^-$  (células sin flagelos), se observaron las células por microscopía electrónica de transmisión. En la Fig. 24A se muestran células correspondientes a la cepa parental AM1, en la cual se pueden observar múltiples flagelos, mientras que la mutante en RSWS8N\_12065 presenta múltiples flagelos, lo que sugiere que RSWS8N\_12065 no tiene una función relacionada con el ensamblaje. El flagelo se puede aislar de la célula con el objetivo de observar las características estructurales, por esta razón, se obtuvieron las estructuras de filamento-gancho-cuerpo basal (Fig. 24B) tanto de AM1 como de la mutante IM1. En éstas se pueden apreciar las tres partes que conforman al flagelo, que en este caso son muy similares entre ambas cepas. Estos resultados indican que el fenotipo de esta mutante es  $Mot^-$ , por lo que pareciera que la proteína codificada por RSWS8N\_12065 tiene una función relacionada con el motor flagelar. Dado que hasta la fecha esta proteína no se ha estudiado no se le ha asignado un nombre, por lo que se le asignó el nombre tentativo de MotK, pues posiblemente es un componente asociado al motor.

Además, se hizo un ensayo de *western-blot* de las estructuras de filamento-gancho-cuerpo basal aisladas de la mutante, para este ensayo se utilizó un anticuerpo contra MotK en una dilución 1:1,000. No se pudo observar la banda correspondiente a la proteína MotK en estas estructuras aisladas (Datos no mostrados), esta información sugiere que MotK podría formar una estructura lábil que con el protocolo de aislamiento de filamento-gancho-cuerpo basal se pierde.



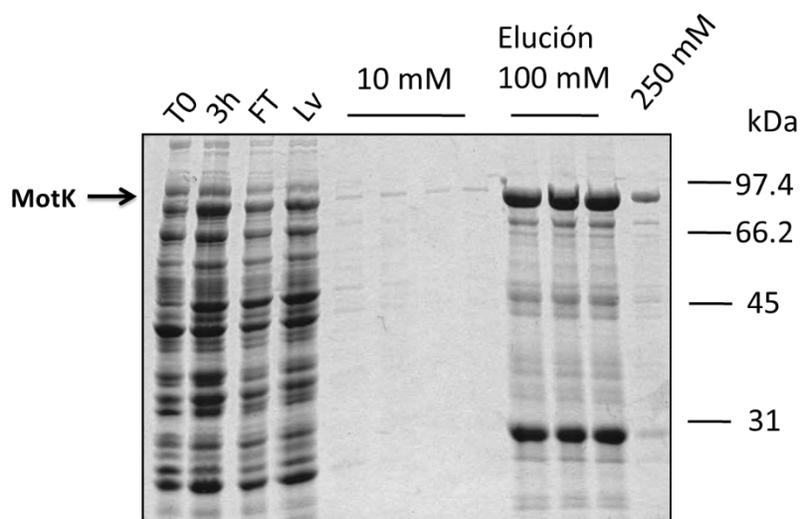
**Figura 24.** Micrografías electrónicas que muestran A) células correspondientes a las cepas AM1 y la mutante interrumpida en RSWS8N\_12065 (IM1) y B) filamento-gancho-cuerpo basal aislados de ambas cepas.

### **Purificación de MotK recombinante en condiciones desnaturalizantes**

Con el fin de poder generar anticuerpos contra MotK para poder estudiar dicha proteína, se generó una versión recombinante de MotK que carece de la secuencia señal. La secuencia clonada se encuentra en el vector pBADHisA que añade una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino de la proteína. Se realizaron curvas de inducción con diferentes concentraciones de arabinosa y diferentes tiempos para poder determinar la mejor condición de inducción, y se determinó que a las 2 h con una concentración de 0.002% de arabinosa correspondía a la mayor inducción. Además, se hizo un fraccionamiento y se encontró mayoritariamente a MotK en la fracción soluble (Datos no mostrados).

Haciendo uso de la etiqueta de histidinas, la purificación de MotK se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de agarosa Ni-NTA. Sin embargo, en las

purificaciones de MotK en condición soluble, no fue posible obtener a la proteína con un mayor grado de pureza, pues en la elución se observan varias bandas de diferente peso molecular al de MotK (Ver sección purificación de MotK recombinante soluble). Por lo tanto, se purificó a MotK en condiciones desnaturalizantes para obtener la mayor cantidad de proteína, posteriormente se separaron las bandas correspondientes a las proteínas mediante electroforesis desnaturalizante (Fig. 25) y se procedió a cortar la banda correspondiente a MotK (masa molecular predecida de MotK recombinante de 70.5 kDa, masa molecular aparente de 78 kDa). De esta forma se obtuvo a MotK para poder generar los anticuerpos contra esta proteína.



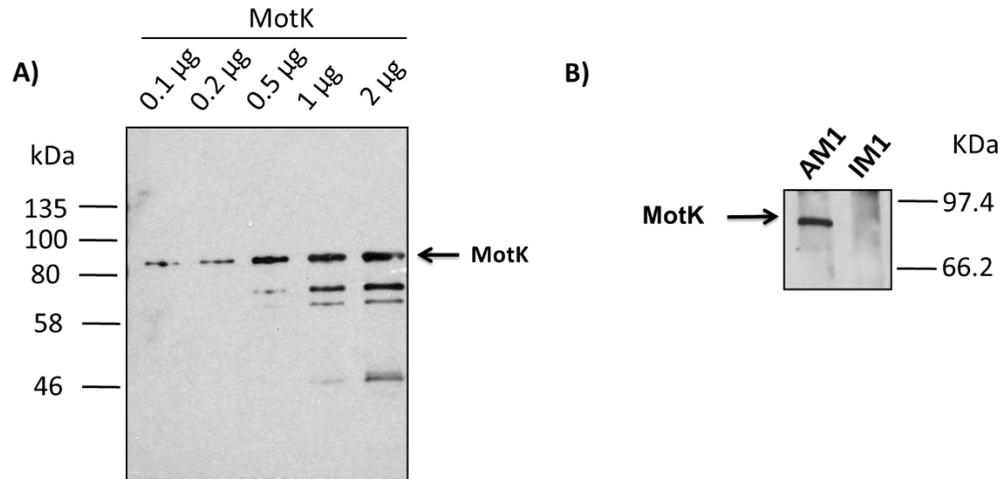
**Figura 25.** Purificación de la proteína MotK en condiciones desnaturalizantes. La purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad. Los lavados y la elución se realizaron con la concentración de imidazol señalada. Gel SDS 12.5% de acrilamida. Tinción Coomassie. Con una flecha se señala a MotK. T0: sin inducir; 3h: 3 horas de inducción; FT (del inglés, *Flow Through*, la fracción no unida); Lv: lavado sin imidazol.

### Inmunodetección de MotK

Con el fin de evaluar la especificidad con la que los anticuerpos generados, reconocían a la proteína recombinante y nativa, se realizaron ensayos de *western-blot*. El anticuerpo contra MotK reconoce a la proteína recombinante desde 0.1  $\mu$ g de concentración de la proteína, y conforme se incrementa la cantidad, se detecta señal en otras bandas (Fig. 26A) que correlacionan con las observadas en la tinción Coomassie de la purificación por cromatografía de afinidad (Fig. 25), así que posiblemente podrían deberse degradación o

productos truncos de la proteína.

Utilizando extractos totales de *R. sphaeroides* se pudo detectar a la proteína nativa en AM1 pero no así en la mutante IM1 (*motK::aadA*) lo que confirmó que el fenotipo observado en la mutante IM1 se debe a la ausencia de MotK (Fig. 26B).



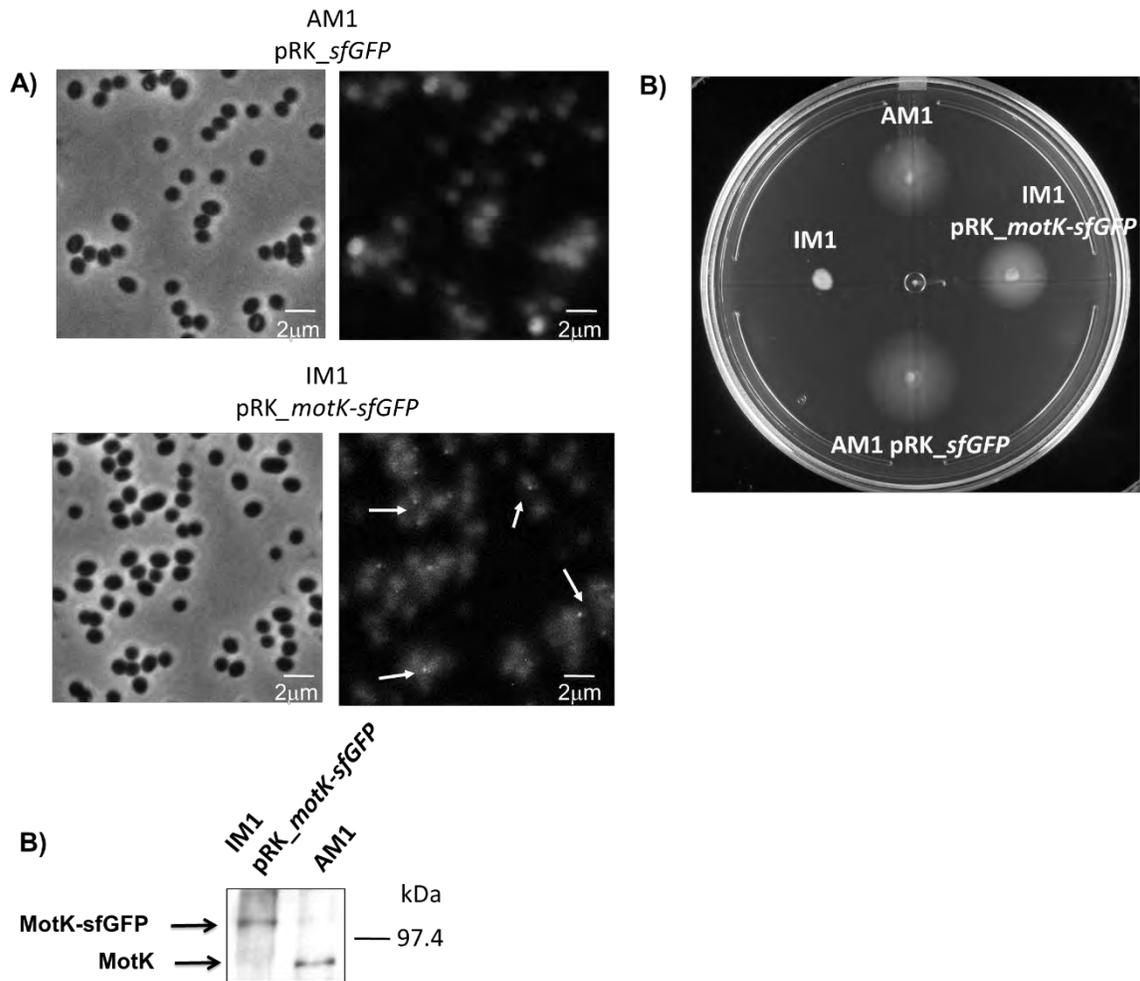
**Figura 26.** Inmunodetección de MotK. A) Inmunodetección de la proteína recombinante pura con cantidades crecientes de ésta. Se utilizó suero  $\alpha$ -MotK en dilución 1:10,000. B) Extractos totales de las cepas *R. sphaeroides* indicadas. Se utilizaron gamma globulinas  $\alpha$ -MotK en una dilución 1:1,000. Con una flecha se señala la señal correspondiente a MotK.

### Localización de MotK-sfGFP

La proteína MotK es sin duda un nuevo componente del sistema flagelar Fla2 de *R. sphaeroides*, sin embargo, se desconoce su localización o su interacción con otros componentes flagelares. Así que para determinar la localización de MotK, se construyó la fusión MotK-sfGFP. Este marcador fluorescente se utilizó considerando dos aspectos: primero que MotK posee una secuencia señal de exportación de la vía Sec, por ello, se colocó en el extremo carboxilo y segundo, se utilizó la sfGFP (del inglés, *superfolder Green Fluorescent Protein*) pues se sabe que esta variante de la proteína GFP puede fluorescer en el periplasma (Aronson *et al.*, 2011; Dinh y Bernhardt, 2011).

En el control AM1 pRK\_*sfGFP* se observaron algunos puntos de fluorescencia en algunas células, sin embargo, en la mayoría, se observó fluorescencia difusa, distribuida a lo largo de toda la célula. Mientras que, en la cepa IM1 pRK\_*motK-sfGFP*, se observó un único

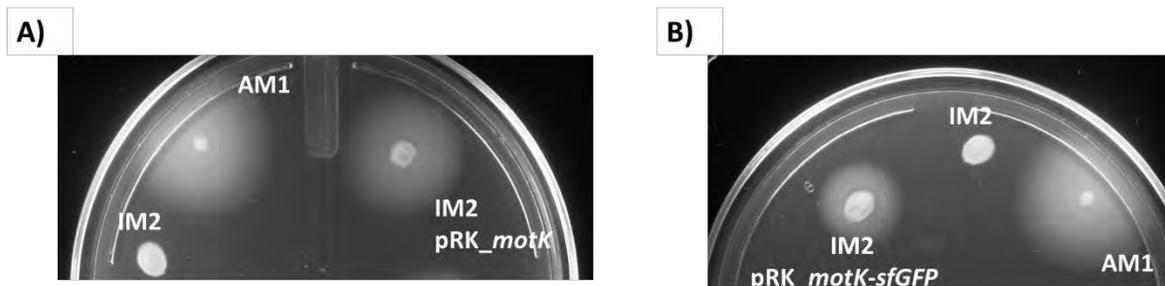
punto de fluorescencia localizado en el polo de la célula (Fig. 27A). Además, la fusión *motK-sfGFP* es completamente funcional pues complementa a la mutante IM1 (Fig. 27B) y mediante una inmunodetección utilizando anticuerpos contra MotK, se pudo detectar la presencia de la proteína MotK fusionada a sfGFP, que tiene un peso aproximado de 100 kDa (Fig. 27C).



**Figura 27.** Localización de MotK-sfGFP. La proteína MotK se fusionó a la proteína sfGFP en el extremo carboxilo. A) Se muestran imágenes representativas de la cepa AM1 pRK\_sfGFP e IM1 pRK\_motK-sfGFP. B) Ensayos en placas de nado de la cepa parental AM1, la mutante IM1 (*motK::aadA*) y la mutante *motK::aadA* complementada con la fusión pRK\_motK-sfGFP. Con flechas blancas se señalan algunos de los puntos de localización. C) Inmunodetección de la proteína de fusión MotK-sfGFP. Se utilizaron gamma globulinas  $\alpha$ -MotK en una dilución 1:1,000.

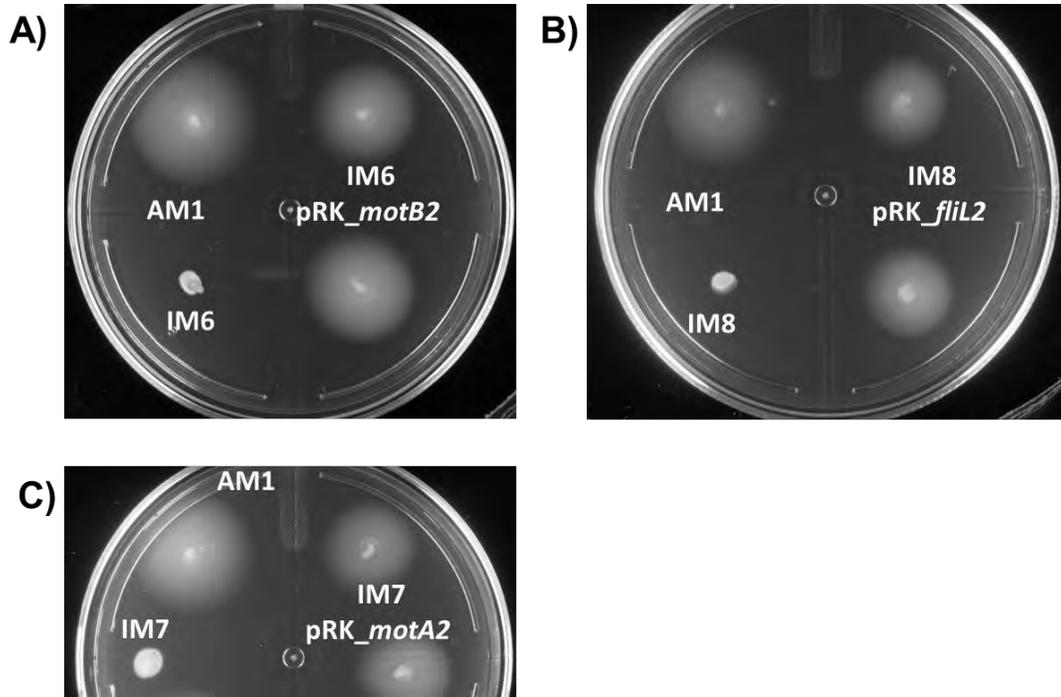
Tomando en cuenta que MotK posee una secuencia señal y que por lo tanto su

localización posiblemente es periplásmica y que además, la mutante IM1 tiene un fenotipo  $Mot^-$ , esto sugiere que MotK podría formar parte del motor flagelar. Para explorar esta hipótesis, se probó la localización de MotK-sfGFP en diferentes fondos genéticos. Para ello, primero se requerían mutantes dobles en componentes del motor, pues en la cepa AM1 la fusión MotK-sfGFP no localiza, quizá porque no compite con la copia cromosomal de MotK (Datos no mostrados). Así que se requerían resistencias a dos antibióticos diferentes. Entonces, se hizo una construcción en la que se removió la mayor parte de la secuencia de *motK* y se insertó un casete de resistencia a higromicina. Posteriormente, se evaluó el fenotipo de esta nueva mutante utilizando cajas de agar suave (Fig. 28). La cepa IM2 ( $\Delta motK::hgo$ ) es no mótil y la habilidad de nado se recuperó utilizando un vector con una copia del *motK* sola (Fig. 28A) y fusionada a la proteína sfGFP (Fig. 28B). La examinación del nado utilizando microscopía de campo oscuro de alta intensidad, mostró que la población nadadora de  $\Delta motK$  complementada, era muy baja, es decir, al parecer esta construcción no se complementa bien.



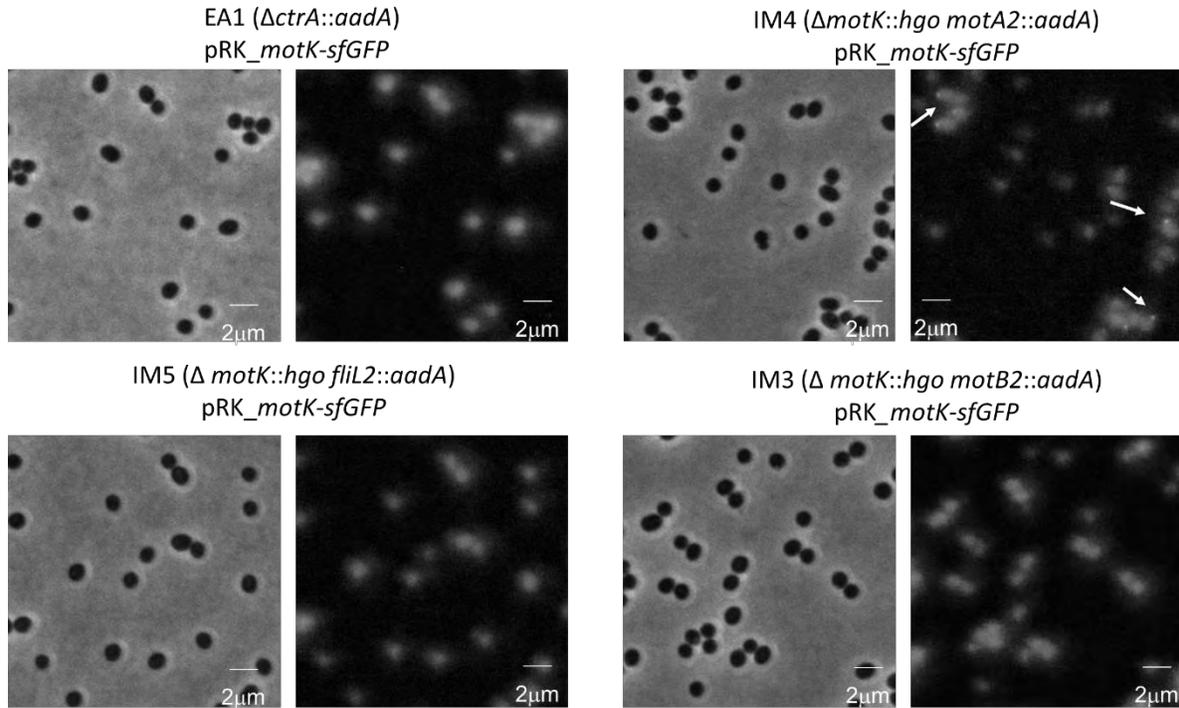
**Figura 28.** Habilidad de nado de la deleción en *motK*. A) Nado de AM1, la mutante  $\Delta motK$  y  $\Delta motK$  pRK\_*motK*. B) Halos de nado de AM1, IM2 ( $\Delta motK::hgo$ ) y la mutante IM2 complementada con la fusión pRK\_*motK*-sfGFP.

También se evaluó el fenotipo de las mutantes sencillas en los componentes del motor *motB2*, *fliL2* y *motA2*. En todos los casos se observa un fenotipo no mótil, que recupera la capacidad de nado cuando se inserta una copia en *trans* del gen (Fig. 29). Por lo tanto, las construcciones en estos genes, así como la nueva mutante en *motK*, no tienen efectos polares sobre los genes río abajo. Sobre el fondo genético de la nueva mutante IM2 se insertaron las versiones mutantes en *motB2*, *fliL2* y *motA2* con un casete de resistencia a espectinomicina, para obtener mutantes dobles, que como era de esperarse, su fenotipo fue no mótil (Resultado no mostrado).



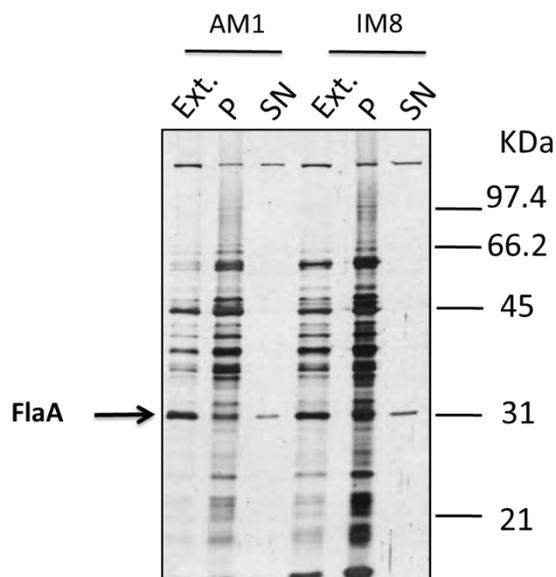
**Figura 29.** Ensayo de nado de las mutantes sencillas A) IM6 (*motB2::aadA*), B) IM8 (*fliL2::aadA*) e C) IM7 (*motA2::aadA*). Como referencia, se inoculó a la cepa parental AM1. También se muestran las complementaciones de las diferentes mutantes.

Posteriormente, se probó la localización de MotK-sfGFP en diferentes cepas. Primero se evaluó la capacidad de localización de la fusión MotK-sfGFP en la cepa EA1 ( $\Delta ctrA::aadA$ ) que no expresa el sistema flagelar 2. En esta cepa, no se observó punto de localización, sugiriendo que MotK-sfGFP requiere algún componente flagelar para localizarse (Fig. 30). Después, se probó la localización de MotK-sfGFP en las mutantes dobles IM4 ( $\Delta motK::hgo motA2::aadA$ ), IM3 ( $\Delta motK::hgo motB2::aadA$ ) e IM5 ( $\Delta motK::hgo fliL2::aadA$ ). En la cepa IM4, la fusión MotK-sfGFP forma puntos de localización en el polo de la misma forma que ocurre en el caso de la mutante IM1 (Fig. 27A y 30). En contraste, en la mutante IM3 no se formaron puntos de localización (Fig. 30). Esta información sugiere que MotK-sfGFP no requiere de MotA2 para localizarse, pero esta fusión podría ser inestable en ausencia de MotB2.



**Figura 30.** Dependencia de otras proteínas flagelares para la localización de MotK-sfGFP. Se muestran imágenes representativas de la localización de MotK-sfGFP en los diferentes fondos genéticos señalados. Con flechas blancas se señalan algunos de los puntos de localización.

En la mutante IM5 tampoco se detectaron puntos de localización de MotK-sfGFP (Fig. 30). Es necesario considerar que las mutantes en *fliL* en diferentes bacterias poseen dos tipos de fenotipos, es decir, Mot<sup>-</sup> o Fla<sup>-</sup>. Así que se decidió determinar la habilidad de una mutante sencilla IM8 de *R. sphaeroides* para ensamblar flagelos. Para ello se hizo un rasurado (del inglés, *shearing*) a las células, con el fin de liberar las estructuras extracelulares de la célula, posteriormente se separa el sobrenadante de la pastilla y se busca la presencia de la flagelina en ambas fracciones. En la Fig. 31, se observa en el sobrenadante la presencia de la proteína del filamento (FlaA) en la cepa control (AM1) y en la mutante IM8. Por lo tanto, tomando en cuenta el fenotipo no mótil y la presencia de la proteína del filamento en el medio extracelular, los resultados indican que la carencia de FliL2 genera un fenotipo Mot<sup>-</sup>. Así que, los resultados de localización de MotK-sfGFP junto con el fenotipo, sugieren que la fusión requiere de FliL2 para localizarse.

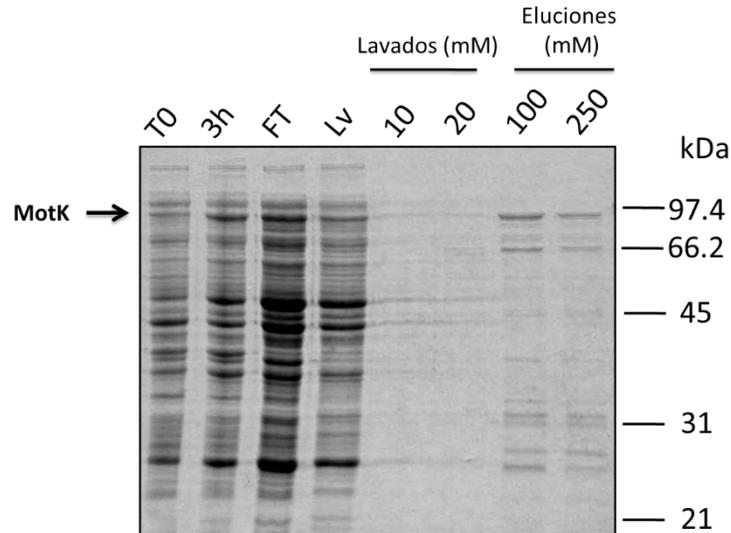


**Figura 31.** *Shearing* de AM1 e IM8 (*fliL2::aadA*). Ext.: Extracto total; P: pastilla y SN: sobrenadante. Con una flecha se indica la banda correspondiente a la flagelina (FlaA) del sistema flagelar 2 (Fla2) de *R. sphaeroides*.

### Purificación de MotK recombinante soluble

Con la idea de que MotK posiblemente se encuentra en el periplasma y probablemente interactúa con el estator. Se decidió explorar la interacción *in vitro* entre MotB2 y MotK. Para ello se requirió purificar a ambas proteínas.

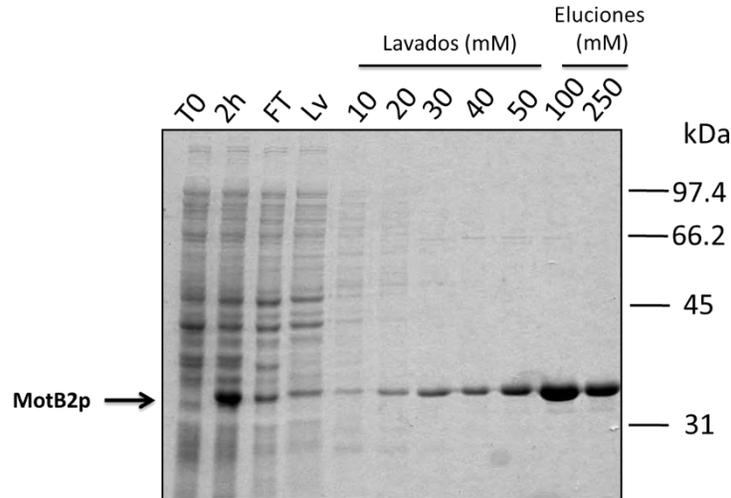
MotK recombinante soluble se purificó por cromatografía de afinidad. Esta versión de MotK no posee secuencia señal y además, tiene una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino. El resultado de la purificación se muestra en la Fig. 32. Desafortunadamente, durante el proceso de purificación no fue posible obtener una proteína con mayor grado de pureza, a pesar de este inconveniente, la proteína obtenida de la elución se utilizó para los ensayos de interacción proteína-proteína.



**Figura 32.** Purificación de MotK soluble. La inducción se hizo con 0.002% de L-arabinosa durante 3 h. Se indica la concentración de imidazol utilizada en los lavados y eluciones. Gel SDS 12.5% de acrilamida. Tinción Coomassie. Con una flecha se señala la banda que corresponde a MotK. T0: sin inducir; 3h: 3 horas de inducción; FT (del inglés, *Flow Through*, la fracción no unida); Lv: lavado sin imidazol.

### Purificación de MotB2p recombinante

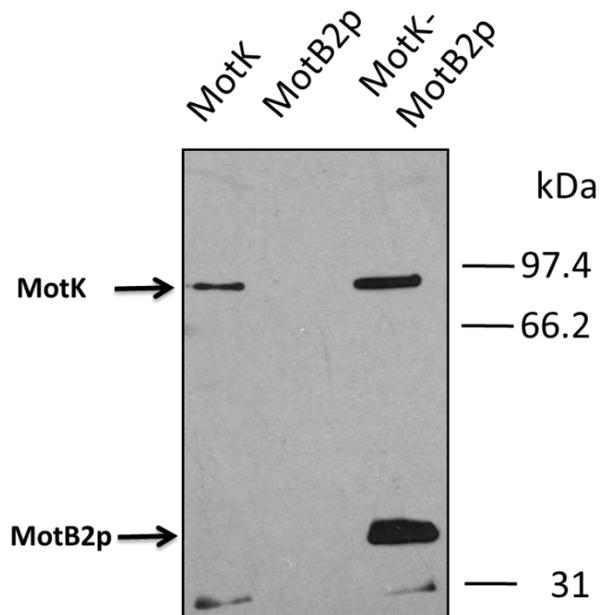
MotB2 es una proteína integral de membrana con una región periplásmica grande. La versión recombinante de MotB2p incluye únicamente la región periplásmica además también posee una etiqueta de histidinas en el extremo amino. La purificación se realizó a partir de la fracción soluble, para ello se indujo con 0.2% de L-arabinosa durante 2 horas y después se procedió a purificar a la proteína por cromatografía de afinidad. En la Fig. 33 se pueden observar los diferentes pasos de la purificación. Con los diferentes lavados se eliminaron varias bandas contaminantes y en la elución se obtuvo una fracción con un buen grado de pureza.



**Figura 33.** Purificación de MotB2p. Purificación realizada mediante cromatografía de afinidad. Se indica la concentración de imidazol utilizada en los lavados y eluciones. Con una flecha se señala la banda que corresponde a MotB2p. T0: sin inducir; 3h: 3 horas de inducción; FT (del inglés, *Flow Through*, la fracción no unida); Lv: lavado sin imidazol.

### Ensayo de interacción de proteína-proteína: coimmunoprecipitación

Con el fin de determinar la interacción entre MotK y MotB2p, se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación. Para ello, a una resina de sefarosa unida a la proteína A se le acoplaron gamma globulinas  $\alpha$ -MotK, posteriormente se agregaron las proteínas a evaluar solas o juntas y se realizaron varios lavados, el resultado se analizó mediante *western-blot* (Fig. 34). En el carril 1 se puede observar la señal generada por MotK ya que fue reconocida por su propio anticuerpo; el carril 2 es un control negativo en el cual no hay ninguna señal, indicando que el anticuerpo  $\alpha$ -MotK no reconoce de forma inespecífica a MotB2p; mientras que en el carril 3 se observa señal de ambas proteínas. Por lo tanto, se puede concluir que MotB2p interactúa con MotK.



**Figura 34.** Ensayo de coimmunoprecipitación. Inmunoprecipitación de MotB2 en presencia de MotK. Se utilizaron  $0.07 \mu\text{M}$  de MotK y MotB2. Cabe indicar que debido a que MotK no se encuentra con un buen grado de pureza, se calculó que aproximadamente el 40% de toda la elución correspondía a MotK (Ver Fig. 32) y en base a esto, se hicieron los cálculos de concentración.

## Discusión

El *locus* de *fla2* de *R. sphaeroides* es sistema flagelar de herencia vertical de la bacteria (Poggio *et al.*, 2007). En *fla2*, se encuentran los homólogos de las proteínas estructurales que se encuentran ampliamente caracterizadas en bacterias entéricas como *E. coli* y *S. enterica*. Sin embargo, existen algunos marcos de lectura abierto de función desconocida, uno de ellos es RSWS8N\_12065.

En este trabajo se caracterizó a RSWS8N\_12065 que llamamos *motK*. La proteína codificada por este gen, MotK, no tiene ningún homólogo caracterizado funcionalmente. Sin embargo, los homólogos se encontraron únicamente en miembros pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*, por lo que podría ser que el producto de este gen sea un nuevo componente específico de esta familia. Una búsqueda bioinformática, reveló que los operones putativos en los que se encuentran los homólogos a *motK* están conservados (Fig. 20), e incluyen componentes del motor flagelar (FliL y MotA), lo que sugiere que su participación está relacionada con el motor.

Se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas, para determinar algunas características de la proteína MotK. Se encontró que ésta es una proteína de 68.5 kDa, sin cruces transmembranales y con una secuencia señal de secreción por la vía Sec, para localización periplásmica (Fig. 21 y 22).

Con el fin de poder asignar una función a MotK se evaluó la capacidad de nado de la mutante correspondiente, la cual mostró un fenotipo no mótil (Fig. 23) que se pudo asignar como fenotipo Mot<sup>-</sup> (Fig. 24), estos resultados concuerdan con el fenotipo de una mutante en el gen homólogo, previamente reportado en *Silicibacter* sp. Sin embargo, su función, en *R. sphaeroides* no pareciera estar relacionada con la exportación o la biosíntesis como se propuso en ese trabajo (Belas *et al.*, 2009). Por lo tanto, MotK no es fundamental para la biogénesis del flagelo, pero sí es esencial para la rotación.

Mediante un enfoque *in vivo* se exploraron tanto la localización como las posibles interacciones de MotK con otras proteínas flagelares. Para esto, la proteína sfGFP se fusionó a MotK (Fig. 27). Como era de esperarse, la localización de esta proteína depende de CtrA (Fig. 30), que es el regulador de respuesta que enciende la transcripción de *fla2* (Vega-Baray

*et al.*, 2015), por lo tanto, esta fusión requiere de otras proteínas flagelares para localizarse y/o estabilizarse. Entonces, tomando en consideración la posibilidad de que MotK pudiera interactuar con algunos de los componentes del motor flagelar, se evaluó la capacidad de localización de MotK en fondos genéticos carentes de algunos componentes del motor. Se encontró que la localización de la fusión MotK-sfGFP parece depender de FliL2 y MotB2 pero no así de MotA2 (Fig. 30). Esta información indica que MotK-sfGFP podría interactuar con componentes del motor flagelar, específicamente con FliL2 y MotB2. Cabe mencionar que esta información es especulativa, pues resulta necesario poder determinar la estabilidad de la fusión MotK-sfGFP, ya que podría ocurrir que en ausencia de MotB2 y/o FliL2, la fusión MotK-sfGFP se pudiera degradar rápidamente y por ello no se detectó localización.

Sería interesante determinar el papel de FliL2 en el sistema flagelar 2, pues los diferentes homólogos de esta proteína tienen funciones diversas. En *V. alginolyticus* se ha sugerido que interactúa con el estator para estabilizarlo a través de su región periplásmica, por lo tanto, está involucrada con la generación del torque (Zhu *et al.*, 2015). En *S. enterica* y en *E. coli* tiene un papel similar (Partridge *et al.*, 2015), aunque en *E. coli* se ha puesto en duda el papel de FliL en funciones relacionadas con el torque (Chawla *et al.*, 2017). En *B. burgdorferi* ayuda a determinar la orientación del flagelo periplásmico (Motaleb *et al.*, 2011). En *C. crescentus*, la expulsión del flagelo es un proceso fundamental en la diferenciación de la célula, de nadadora a prostecada. En esta transición, el anillo MS se degrada y para este proceso se requiere tanto FliL como PleD (Aldridge y Jenal, 1999; Kanbe *et al.*, 2005). Además, FliL también se requiere para la rotación de flagelo (Jenal *et al.*, 1994). En *Proteus mirabilis*, FliL está involucrada en la diferenciación de células para nado en enjambre a través la síntesis del filamento (Belas y Sivanasuthi, 2005). Y en Fla1 de *R. sphaeroides*, la ausencia de FliL afecta el nado y se propuso que junto con MotF, está relacionada con la rotación del flagelo a través de MotB (Suaste-Olmos, *et al.*, 2010; Ramírez-Cabrera, *et al.*, 2012). En este caso, en el sistema flagelar 2 de *R. sphaeroides*, una mutante en *fliL2* tiene un fenotipo Mot- (Fig. 31), por lo que sugiere una relación de esta proteína con el motor.

La información obtenida de la localización de MotK-sfGFP, indica que no requiere de MotA2 para su localización, sin embargo, MotB2 sí parece ser importante para la localización (Fig. 30), quizá mediante una interacción directa. Para poner a prueba esta

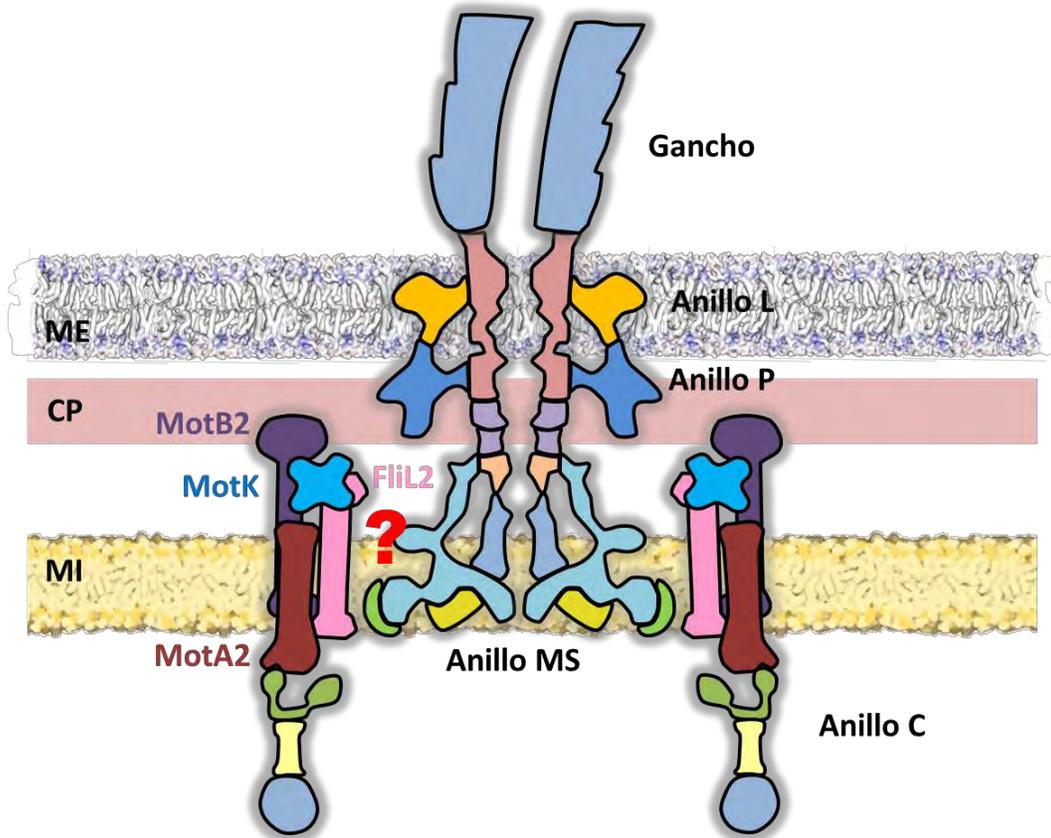
hipótesis, se realizó un ensayo de interacción entre MotK y la región periplásmica de MotB2, encontrando una interacción positiva (Fig. 34). Con base a los resultados obtenidos del ensayo de interacción y de localización de MotK-sfGFP, una especulación podría ser que MotB2 y/o FliL2 estabilizan a MotK y quizá mediante su interacción con otras proteínas se puede reclutar a la base del flagelo.

Como ya se mencionó, a partir de la secuencia primaria de la proteína MotK, no fue posible encontrar un homólogo con función conocida. Sin embargo, otro enfoque para poder asignar una función a MotK, podría ser buscar proteínas con características similares en otras bacterias, y en este sentido existen dos candidatos reportados: MotC y PflA.

MotC, reportada y caracterizada en *S. meliloti* (Platzer *et al.*, 1997), es una proteína de 53 kDa que tiene una secuencia señal para la vía Sec y que se sabe interactúa con la región periplásmica de MotB. Se ha sugerido que su función es ejercer un control sobre la velocidad del motor a través de MotB (Platzer *et al.*, 1997). Además, también se ha reportado que MotC requiere de la proteína MotE para ser estable (Eggenhofer *et al.*, 2004). Interesantemente, en algunos de los contextos genómicos, se encontraron homólogos a MotE, en el lugar que corresponde a RSWS8N\_12055, que se encuentra río arriba de *motA2* (Fig. 20). Entonces, podría existir la posibilidad de que MotK y MotC tengan funciones similares. Esta especulación se ve apoyada por el hecho de que MotK se encuentra en un operón putativo con el homólogo de MotE y además, MotK y la región periplásmica de MotB2 interactúan (Fig. 34).

El otro candidato es PflA, esta proteína posee una secuencia señal para localización periplásmica. Mientras que PflB, es una proteína membranal con la región amino terminal citoplásmica y un dominio periplásmico grande (Beeby *et al.*, 2016). Además, ambas proteínas poseen múltiples motivos TPR (del inglés, *Tetra Tricopeptide Repeat*), los cuales se sabe que están involucrados en la interacción proteína-proteína como andamiaje (Blatch y Lässle, 1999). Se ha propuesto que en *C. jejuni* se ensambla el disco basal formado por FlgP, que sirve de plataforma para la formación del disco medio conformado por PflA y posteriormente la polimerización de PflB en el disco proximal. El ensamblaje del disco proximal permite la incorporación de los complejos estatores al motor (Beeby *et al.*, 2016). En este sentido, quizá MotK podría actuar como reclutadora del estator de Fla2.

Recientemente se han descubierto nuevos componentes asociados al motor flagelar, esto muestra la diversidad estructural de los motores rotatorios (Chen *et al.*, 2011). Estos componentes pueden formar estructuras que no tienen contraparte en los motores de bacterias entéricas. En algunos casos ha sido posible visualizar parte de los componentes proteicos que forman dichas estructuras como es el caso del collar en espiroquetas (Moon *et al.*, 2016), o los de los complejos disco en *C. jejuni* y *V. fischeri* (Beeby *et al.*, 2016). En contraste, en *H. pylori*, se desconoce que componentes conforman a la estructura tipo jaula que se ha observado (Qin *et al.*, 2016). A pesar de la información escasa sobre estas nuevas estructuras, en todos los casos se han observado asociaciones con diferentes componentes del motor, especialmente con el estator. Por lo que se ha propuesto que podrían servir como estructuras de andamiajes de éste (Beeby *et al.*, 2016). Considerando esta información junto con los datos experimentales, estos datos invitan a pensar que quizá MotK también podría formar parte de una nueva estructura en el motor flagelar de Fla2 (Fig. 35), sin embargo, se requieren más estudios estructurales.



**Figura 35.** Modelo que muestra la posible localización de MotK. Se señala a la proteína MotK y su posible interacción con otras proteínas del motor flagelar. Se propone la localización de FliL2 con base en los datos obtenidos en otras bacterias. ME: membrana externa; CP: capa de peptidoglicano; MI: membrana interna (Modificado de Evans *et al.*, 2014).

## Conclusiones

- La proteína codificada por RSWS8N\_12065 (*motK*) es esencial para la motilidad mediada por Fla2 en *Rhodobacter sphaeroides*.
- El arreglo genético en el que se encuentra RSWSN\_12065 (*motK*) se encuentra conservado en la familia *Rhodobacteraceae*.
- La proteína de fusión MotK-sfGFP requiere de otras proteínas flagelares para localizarse, pues en la mutante CtrA<sup>-</sup>, que es el regulador de respuesta que enciende *fla2* no se localiza dicha fusión. Este componente podría ser FliL2 o MotB2, ya que en su ausencia, tampoco se encontró un punto de localización.
- La fusión MotK-sfGFP no parece requerir de MotA2 para localizarse.
- MotK es un nuevo componente asociado al motor ya que interacciona con la región periplásmica de MotB2, que es un componente del estator.

## Perspectivas

- Determinar la localización subcelular de MotK utilizando inmunodetección por ensayos de *western-blot*, con el fin de corroborar la información obtenida del análisis bioinformático de la secuencia señal.
- Determinar la estabilidad de MotK-sfGFP, en las diferentes mutantes utilizadas, por inmunodetección con ensayos de *western-blot*. Esta información podría indicar si la falta de localización de MotK-sfGFP en los fondos genéticos IM5 ( $\Delta\text{motK}::\text{hgo fliL2}::\text{aadA}$ ) e IM3 ( $\Delta\text{motK}::\text{hgo motB2}::\text{aadA}$ ) se debe a que la proteína no es producida o se degrada rápidamente.
- Colocalizar la fusión MotK-sfGFP con el flagelo mediante inmunotinción de la proteína del gancho (FlgE2) o el filamento (FlaA). Este experimento serviría para comprobar que la localización observada por la fusión MotK-sfGFP efectivamente correlaciona con el flagelo y por lo tanto, es localización específica.
- Probar la interacción entre MotK y FliL2 mediante coimmunoprecipitación o usando la técnica de *Far western*, con el fin de determinar si en la cepa IM5 ( $\Delta\text{motK}::\text{hgo fliL2}::\text{aadA}$ ) la ausencia de localización de MotK-sfGFP se debe a una interacción directa entre MotK y FliL2.
- Caracterizar el papel de FliL2 en el sistema flagelar 2, para poder entender la relación de esta proteína con MotK, así como su función con otros componentes flagelares.
- Determinar la estabilidad y/o localización del estator en la cepa IM8 ( $\text{fliL2}::\text{aadA}$ ), puesto que en otras bacterias, se ha sugerido FliL está relacionada con la estabilización del estator. Así que si el estator no fuera estable o no estuviera localizado en ausencia de FliL2, podría explicar la ausencia de localización de MotK.
- Determinar la localización del estator, mediante una fusión fluorescente con MotB2, en el fondo genético IM2 ( $\Delta\text{motK}::\text{hgo}$ ), ya que sería interesante conocer si el estator puede localizar en ausencia de MotK.
- Determinar el orden de ensamblaje de las proteínas asociadas al motor, específicamente FliL2, MotK, MotA2 y MotB2 utilizando fusiones fluorescentes en diferentes fondos genéticos.

- Determinar la estequiometría de MotK en Fla2, utilizando la fusión MotK-sfGFP, se puede cuantificar la fluorescencia generada por esta fusión para poder estimar el número de copias presentes en el flagelo.

## Referencias

- Aldridge, P. y Jenal, U. 1999. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. **Molecular Microbiology**. 32(2): 379-391.
- Armitage, J.P. y Schmitt, R. 1997. Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* – variations on a theme?. **Microbiology**. 142(Pt 12): 3671-3682.
- Attmannspacher, U., Scharf, B.E. y Harshey, R.M. 2008. FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**. 68(2): 328-341.
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G.M. y Hughes, C. 2001. Flagellin polymerization control by a cytosolic export chaperon. **Journal of Molecular Biology**. 308(2): 221-229.
- Abby, S.S. y Rocha, E.P.C. 2012. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. **PLoS Genetics**. 8(9): e1002983.
- Akiba, T., Yoshimura, H. y Namba, K. 1991. Monolayer crystallization of flagellar L-P rings by sequential addition and depletion of lipid. **Science**. 252(5012): 1544-1546.
- Ardissone, S. y Viollier, P.H. 2015. Interplay between flagellation and cell cycle control in *Caulobacter*. **Current Opinion in Microbiology**. 28: 83-92.
- Aronson, D.E., Costantini, L.M. y Snapp, E.L. 2011. Superfolder GFP is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon. **Traffic**. 12(5): 543-548.
- Asakura, S. 1970. Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. **Advances in Biophysics**. 1: 99-155.
- Bao, K. y Cohen, S.N. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. **Genes & Development**. 15(12): 1518-1527.
- Bi, S. y Lai, L. 2015. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**. 72(4): 691-708.
- Beeby, M., Ribardo, D.A., Brennan, C.A., Ruby, E.G., Jensen, G.J. y Hendrixson, D.R. 2016. Diverse high-torque bacterial flagellar motors assemble wider stators rings using a conserved protein scaffold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 113(3): E19717-1926.
- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. **Trends in Microbiology**. 22(9): 517-527.
- Belas, R., Horikawa, E., Aizawa, S.-I. y Suvanasuthi, R. 2009. Genetics determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. **Journal of Bacteriology**. 191(14): 45-02-45-12.
- Belas, R. y Suvanasuthi, R. 2005. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. **Journal of Bacteriology**. 187(19): 6789-6803.

- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. 62(3): 293-300.
- Blatch, G.L. y Lässle, M. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. **Bioessays**. 21(11): 932-939.
- Braun, T.F, Al-Mawsawi, L.Q., Kojima, S. y Blair, D.F. 2004. Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. **Biochemistry**. 43(1): 35-45.
- Braun, T.F. y Blair, D.F. 2001. Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H<sup>+</sup> channels in the stator complex. **Biochemistry**. 40(43): 13051-13059.
- Braun, T.F., Poulson, S., Gully, J.B., Empey, J.C., Van Way, S., Putnam, A. y Blair, D.F. 1999. Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. 181(11): 3542-3551.
- Brown, P.N., Mathews, M.A., Joss, L.A., Hill, C.P. y Blair, D.F. 2005. Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. **Journal of Bacteriology**. 187(8): 2890-2892.
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Hendrixson, D.R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E.I., Müller, A., Drobo, M.J. y Jensen, G.J. 2011. Structural diversity of bacterial flagellar motors. **The EMBO journal**. 30(14): 2972-2981.
- Chawla, R., Ford, K.M. y Lele, P.P. 2017. Torque, but not FliL, regulates mechanosensitive flagellar motor-function. **Scientific Reports**. 7(1): 5565.
- Chen, X. y Berg, H.C. 2000. Torque-speed relationship of the flagellar rotatory motor of *Escherichia coli*. **Biophysical Journal**. 78(2): 1036-1041.
- Chevance, F.F. y Hughes, K.T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature Reviews. Microbiology**. 6(6): 455-465.
- Chun, S.Y. y Parkinson, J.S. 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. **Science**. 239(4837): 276-278.
- Cohen, E.J. y Hughes, K.T. 2014. Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. **Journal of Bacteriology**. 196(13): 2387-2395.
- Cohen, E.J., Ferrerira, J.I., Landisky, M.S., Beeby, M. y Hughes, K.T. 2017. Nanoscale-length control of the flagellar driveshaft requires hitting the tethered outer membrane. **Science**. 356(6334): 197-200.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. y Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 69(8): 2110-2114.
- Darnton, N.C., Turner, L., Rojevsky, S. y Berg, H.C. 2007. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. 189(5):1756-1764.
- Davis, J., Donohue, T.J. y Kaplan, S. 1988. Construction, characterization, and complementation of a Puf<sup>-</sup> mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of**

- Bacteriology**. 170(1): 320-329.
- Dean, G.E., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P. y Burks, C. 1984. Gene sequence and predicted amino acid sequence of the *motA* protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. 159(3): 991-999.
- del Campo, A.M., Ballado, T., De la Mora, J., Poggio, S., Camarena, L. y Dreyfus, G. 2007. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. **Journal of Bacteriology**. 189(22): 8397-8401.
- de la Mora, J., Camarena, L. y Dreyfus, G. 2017. Purification of Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides*. **Methods in Molecular Microbiology**. 1593: 273-283.
- de la Mora, J., Uchida, K., Martínez del Campo, A., Camarena, L., Aizawa, S.-I. y Dreyfus, G. 2015. Structural characterization of the Fla2 flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**. 197(17): 2859- 2866.
- Dinh, T. y Bernhardt, T.G. 2011. Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. **Journal of Bacteriology**. 193(18): 4984-4987.
- Dreyfus, G., Williams, A.W., Kawagishi, I. y Macnab, R.M. 1993. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. **Journal of Bacteriology**. 175(10): 3131-3138.
- Eggenhofer, E., Haslbeck, M. y Scharf, B. 2004. MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Microbiology**. 52(3): 701-712.
- Erhardt, M., Hirano, T., Su, Y., Paul, K., Wee, D.H., Mizuno, S., Aizawa, S.-I. y Hughes, K. 2010. The role of the FliK molecular ruler in hook-length control in *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**. 75(5): 1272-1284.
- Erhardt, M., Singer, H.M., Wee, D.H., Keener, J.P. y Hughes, K.T. 2011. An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica*. **The EMBO Journal**. 30(14): 2948-2961.
- Evans, L.D., Hughes, C. y Fraser, G.M. 2014. Building a flagellum outside the bacterial cell. **Trends in Microbiology**. 22(10): 566-572.
- Fabela, S., Domenzain, C., De la Mora, J., Osorio, A., Ramírez-Cabrera, V., Poggio, S., Dreyfus, G. y Camarena, L. 2013. A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**. 195(23): 5285-5296.
- Fahrner, K.A., Block, S.M., Kirshnaswamy, S., Parkinson, J.S. y Berg, H.C. 1994. A mutant hook-associated protein (HAP3) facilitates torsionally induced transformations of the flagellar filament of *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**. 238(2): 173-186.
- Fan, F. y Macnab, R.M. 1996. Enzymatic characterization of FliI and ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. **The Journal of Biological**

- Chemistry**. 271(50): 31981-31988.
- Ferris, H.U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M.B., Kihara, M., Namba, K. y Macnab, R.M. 2005. FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**. 280(50): 41236-41242.
- Francez-Charlot, A., Kaczmarczyk, A. y Vorholt, J.A. 2015. The branched CcsA/CckA-ChpT-CtrA phosphorelay of *Sphingomonas melonis* controls motility and biofilm formation. **Molecular Microbiology**. 97(1): 47-63.
- Francis, N.R., Irikura, V.M, Yamaguchi, S., DeRosier, D.J. y Macnab, R.M. 1992. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89(14): 6304-6308.
- Francis, N.R., Sosinky, G.E., Thomas, D. y DeRosier, D.J. 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. **Journal of Molecular Biology**. 235(4): 1261-1270.
- Fraser, G.M., Hirano, T., Ferris, H.U., Devgan, L.L., Kihara, M. y Macnab, R.M. 2003. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. **Molecular Microbiology**. 48(4): 1043-1057.
- Fraser, G.M., Bennett, J.C.Q. y Hughes, C. 1999. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. **Molecular Microbiology**. 32(3): 569-580.
- Fraser, G.M. y Hughes, C. 1999. Swarming motility. **Current Opinion in Microbiology**. 2(6): 630-635.
- Fujii, T., Kato, T. y Namba, K. 2009. Specific arrangement of  $\alpha$ -helical coiled coils in the core domain of the bacterial flagellar hook for the universal joint function. **Structure**. 17(11): 1485-1493.
- Fujii, T., Kato, T., Hiraoka, K.D., Miyata, T., Minamino, T., Chevance, F.F., Hughes, K.T. y Namba, K. 2017. Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook. **Nature Communications**. 8: 14276.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C. y Wagner, S. 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. **Annual Reviews of Microbiology**. 68: 415-438.
- Galking, V.E., Yu, X., Bielnicki, J., Heuser, J., Ewing, C.P., Guerry, P. y Egelman, E.H. 2008. Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. **Science**. 320(5874): 382-385.
- González-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M. y Namba, K. 2006. Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. **Molecular Microbiology**. 60(4): 984-998.
- Grünenfelder, B., Gehrig, S. y Jenal, U. 2003. Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. **Journal of Bacteriology**. 185(5): 1624-1633.

- Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. **Annual Review of Microbiology**. 57: 249-273.
- Harshey, R. M. y Partridge, J.D. 2015. Shelter in a swarm. **Journal of Molecular Biology**. 427(23): 3683-3694.
- Hasegawa, K., Yamashita, I. y Namba, K. 1998. Quasi- and nonequivalence in the structure of bacterial flagellar filament. **Biophysical Journal**. 74(1): 569-575.
- Hernandez-Valle, J., Domenzain, C., de la Mora, J., Poggio, S., Dreyfus, G. y Camarena, L. 2017. The master regulators of the Fla1 and Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate CheY proteins. **Journal of Bacteriology**. 199(5): e00670-16.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. y Aizawa, S.-I. 1994. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 176(17): 5439-5449.
- Hirano, T., Minamino, T. y Macnab, R. M. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. **Journal of Molecular Biology**. 312(2): 359-369.
- Hosking, E.R., Vogt, C., Bakker, E.P. y Manson, M.D. 2006. The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. **Journal of Molecular Biology**. 364(5): 921-937.
- Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T. y Namba, K. 2011. Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V- type ATPases. **Nature Structural & Molecular Biology**. 18(3): 277-282.
- Ikeda, T., Homma, M., Iino, T., Asakura, S. y Kamiya, R. 1987. Localization and stoichiometry of Hook-associated proteins within *Salmonella typhimurium* flagella. **Journal of Bacteriology**. 169(3): 1168-1173.
- Jenal, U., White, J. y Shapiro, L. 1994. *Caulobacter* flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. **Journal of Molecular Biology**. 243(2): 227-244.
- Jones, C.J., Homma, M. y Macnab, R.M. 1987. Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. 169(4): 1489-1492.
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H. y Aizawa, S. 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar Hook-(Basal-Body) complex of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**. 212(2): 377-387.
- Kanbe, M., Shibata, S., Umino, Y., Jena, U. y Aizawa, S.-I. 2005. Protease susceptibility of the *Caulobacter crescentus* flagellar hook-basal body: a possible mechanism of flagellar ejection during cell differentiation. **Microbiology**. 151(Pt 2): 433-438.
- Karlinsey, J.E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S.-I. y Hughes, K.T. 2000. Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. **Molecular Microbiology**. 37(5): 1220-1231.

- Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N. y Aizawa, S.-I. 1996. Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. **Journal of Molecular Biology**. 255(3): 458-475.
- Khan, S., Dapice, M. y Reese, T.S. 1988. Effects of the *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor. **Journal of Molecular Biology**. 202(3): 575-584.
- Kim, E.A., Price-Carter, M., Carlquist, W.C. y Blair, D.F. 2008. Membrane segment organization in the stator complex of the flagellar motor: implications for proton flow and proton-induced conformational change. **Biochemistry**. 47(43): 11332-11339.
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D. y Trollinger, D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. **Gene**. 70(1): 191-197.
- Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M. y Namba, K. 2009. Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. **Molecular Microbiology**. 73(4): 710-718.
- Kojima, S. y Blair, D.F. 2004. Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. **Biochemistry**. 43(1): 26-34.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. y Aizawa, S.-I. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**. 226(2): 433-446.
- Kubori, T., Yamaguchi, S. y Aizawa, S.-I. 1997. Assembly of the switch complex on the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. **Journal of Bacteriology**. 179(3): 813-817.
- Kutsukake, K., Ikebe, T. y Yamamoto, S. 1999. Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. **Genes & Genetic Systems**. 74(6): 287-292.
- Kutsukake, K. 1997. Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. **Molecular & General Genetics: MGG**. 254(4): 440-448.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. e Iino, T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 172(2): 741-747.
- Kreans, D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**. 8(9): 634-644.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L. y McAdams, H.H. 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 99(7): 4632-4637.
- Lang, A.S. y Beatty, T. 2002. A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. **Journal of Bacteriology**. 184(4): 913-918.
- Leake, M.C., Chandler, J.H., Wadhams, G.H., Bai, F., Berry, R.M. y Armitage, J.P. 2006. Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. **Nature**. 443(7109): 355-358.
- Lele, P.P., Branch, R.W., Nathan, V.S. y Berg, H.C. 2012. Mechanism for adaptive remodeling of the bacterial flagellar switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 109(49): 20018-20022.

- Li, H. y Sourjik, V. 2011. Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. 80(4): 886-899.
- Liu, R. y Ochman, H. 2007. Stepwise formation of the bacterial flagellar system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 104(17): 7116-7121.
- Liu, X. y Matsumura, P. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. **Journal of Bacteriology**. 176(23): 7345-7351.
- Lloyd, S.A. y Blair, D.F. 1997. Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**. 266(4): 733-744.
- Lloyd, S.A., Tang, H., Wang, X., Billings, S. y Blair, D.F. 1996. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence for a direct role for FliG but not for FliM or FliN. **Journal of Bacteriology**. 178(1): 223-231.
- McCarter, L.L. 2006. Regulation of flagella. **Current Opinion in Microbiology**. 9(2): 180-186.
- McCarter, L.L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 65(3): 445-462.
- Macnab, R.M. y Ornston, M.K. 1977. Normal to curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. **Journal of Molecular Biology**. 112(1): 1-30.
- Maier, B. y Wong, G.C.L. 2015. How bacteria use type IV pili machinery on surface. **Trends in Microbiology**. 23(12): 775-788.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, S. y Namba, K. 2010. Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. **Nature Structural and Molecular Biology**. 17(4): 417-422.
- Markowitz, V.M., Chen, I-M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N.N. y Kyrpides, N.C. 2012. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. **Nucleic Acids Research**. 40(D1): D115-D122.
- Martínez, A., Torello, S. y Kolter, R. 1999. Sliding motility in mycobacteria. **Journal of Bacteriology**. 181(23): 7331-7338.
- Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y. y Kudo, S. 1994. Very fast flagellar rotation. **Nature**. 371(6500): 752.
- Merino, S., Shaw, J.G. y Tomás, J.M. 2006. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. **FEMS Microbiology Letters**. 263(2): 127-135.
- Miller, T.R. y Belas, R. 2006. Motility is involved in *Silicibacter* sp. TM1040 interaction with dinoflagellates. **Environmental Microbiology**. 8(9): 1648-1659.
- Minamino, T. e Imada, K. 2015. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. **Trends in Microbiology**. 23(5): 267-274.

- Minamino, T. 2014. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1843(8): 1642-1648.
- Minamino, T., Kinoshita, M., Imada, K. y Namba, K. 2012. Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export. **Molecular Microbiology**. 83(1): 168-178.
- Minamino, T. y Namba, K. 2008. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. **Nature**. 451(7177): 485-488.
- Minamino, T. y Macnab, R.M. 2000a. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. **Molecular Microbiology**. 35(5): 1052-1064.
- Minamino, T. y Macnab, R.M. 2000b. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. **Journal of Bacteriology**. 182(17): 4906-4914.
- Minamino, T., Yamaguchi, S., Macnab, R.M. 2000c. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**. 182(11): 3029-3036.
- Minamino, T. y Macnab, R.M. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. **Journal of Bacteriology**. 181(5): 1388-1394.
- Motaleb, M.A., Pietzer, J.E., Sultan, S.Z. y Liu, J. 2011. A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* *fliL* mutant. **Journal in Bacteriology**. 193(13): 3324-3331.
- Moon, K.H., Zhao, X., Manee, A., Wang, J., Yu, Z., Liu, J. y Motaleb, M.A. 2016. Spirochetes flagellar collar protein FlbB has astounding effects in orientation of periplasmic flagellar, bacterial shape, motility, and assembly of motors in *Borrelia burgdorferi*. **Molecular Microbiology**. 102(02): 336-348.
- Morimoto, Y.V., Ito, M., Hiraoka, K.D., Che, Y.-S., Bai, F., Kami-ike, N., Namba, K. y Minamino, T. 2014. Assembly and stoichiometry of FliF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body. **Molecular Microbiology**. 91(6): 1214-1226.
- Morimoto, Y.V., Nakamura, S., Hiraoka, K.D., Namba, K. y Minamino, T. 2013. Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation. **Journal of Bacteriology**. 195(3): 474-481.
- Morimoto, Y.V. y Minamino, T. 2012. Assembly and activation of the MotA/B proton channel complex of the proton driven flagellar motor of *Salmonella enterica*. *Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. Dr. Bassam Annous. Ed. InTech. DOI: 10.5772/29968.
- Natale, P., Brüser, T. y Driessen, A.J.M. 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1778(9): 1765-1756.
- Nan, B. y Zusman, D.R. 2016. Novel mechanisms power bacterial gliding motility. **Molecular Microbiology**. 101(2): 186-193.

- Nambu, T. y Kutsukake, K. 2000. The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. **Microbiology**. 146(Pt 5): 1171-1178.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M. y Kutsukake, K. 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 181(5): 1555-1561.
- Nishihara, Y. y Kitao, A. 2015. Gate-controlled proton diffusion and protonation-induced ratchet motion in the stator of the bacterial flagellar motor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 112(25): 7737-7742.
- Nguyen, C.C. y Saier, M.H. Jr. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the MotA and MotB families of bacterial flagellar motor proteins. **Research in Microbiology**. 147(5): 317-332.
- O'Brien, E.J. y Bennet, P.M. 1972. Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. **Journal of Molecular Biology**. 70(1): 133-152.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S.-I., Macnab, R.M. e Iino, T. 1994. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 176(8): 2272-2281.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. e Iino, T. 1992. A novel transcription regulation mechanisms in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. **Molecular Microbiology**. 6(21): 3149-3157.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. e Iino, T. 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. **Molecular & General Genetics: MGG**. 221(2): 139-147.
- Osorio-Valeriano, M., de la Mora, J., Camarena, L. y Dreyfus, G. 2015. Biochemical characterization of the flagellar rod components of *Rhodobacter sphaeroides*: properties and interactions. **Journal of Bacteriology**. 198(3): 544-552.
- Parkinson, J.S., Hazelbauer, G.L. y Falke, J.J. 2015. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. **Trends in Microbiology**. 23(5): 257-266.
- Partridge, J.D., Nieto, V. y Harshey, R.M. 2015. A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. **mBio**. 6(2): e0267.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D.F. y Hughes, K.T. 2008. Energy source of flagellar type III secretion. **Nature**. 451(7177): 489-492.
- Paul, K., Harmon, J.G. y Blair, D.F. 2006. Mutational analysis of the flagellar rotor protein FliN: Identification of surfaces important for flagellar assembly and switching. **Journal of Bacteriology**. 188(14): 5240-5248.
- Pédrelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C. y Waldo, G.S. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**. 24(1): 79-88.

- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**. 8(10): 785-786.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**. 83(2): 346-356.
- Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M. y Schmitt, R. 1997. Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotatory speed variation in *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**. 179(20): 6391-6399.
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G., Vinuesa, P. y Camarena, L. 2007. A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**. 189(8): 3208-3216.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. y Armitage, J.P. 2008. *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. **Trends in Microbiology**. 16(6): 251-260.
- Porter, S.L., Wilkinson, D.A., Byles, E.D., Wadhams, G.H., Taylor, S., Saunders, N.J. y Armitage, J.P. 2011. Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* strain WS8N. **Journal of Bacteriology**. 193(15): 4027-4028.
- Qin, Z., Lin, W.T., Zhu, S., Franco, A.T. y Liu, J. 2016. Imaging the motility and chemotaxis machineries in *Helicobacter pylori* by cryo-electron tomography. **Journal of Bacteriology**. 199(3): e00695-16.
- Quandt, J. y Hynes, M.F. 1993. Versatil suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram negative bacteria. **Gene**. 127(1): 15-21.
- Ramírez-Cabrera, Poggio, S., Domenzain, C., Osorio, A., Dreyfus, G. y Camarena, L. 2012. A novel component of the *Rhodobacter sphaeroides* Fla1 flagellum is essential for motor rotation. **Journal of Bacteriology**. 194(22): 6174-6183.
- Saini, S., Brown, J.D., Aldridge, P.D. y Rao, C.V. 2008. FliZ is a posttranslational activator of FlhD<sub>4</sub>FlhC<sub>2</sub>-dependent flagellar gene expression. **Journal of Bacteriology**. 190(14): 4979-4988.
- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., DeRosier, D.J., Kitao, A. y Namba, K. 2004. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. **Nature**. 431(7012): 1062-1068.
- Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M. y Namba, K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. **Nature**. 410(6826): 331-337.
- Sarkar, M.K., Paul, K. y Blair, D. 2010. Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107(20): 9370-9375.
- Sato, K. y Homma, M. 2000. Functional reconstitution of the Na<sup>+</sup>-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. **The Journal of Biological Chemistry**. 275(8): 5718-5722.

- Schoenhals, G.J. y Macnab, R.M. 1996. Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 178(14): 4200-4207.
- Simon, R., Priefer, U. y Puhler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**. 1: 784-791.
- Sistrom, W.R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. **Journal of General Microbiology**. 28: 607-616.
- Sosinsky, G.E., Francis, N.R., DeRosier, D.J., Wall, J.S., Simon, M.N. y Hainfeld, J. 1992. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89(11): 4801-4805.
- Sourjik, V. y Wingreen, N.S. 2012. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. **Current opinion in Cell Biology**. 24(2): 262-268.
- Suaste-Olmos, F., Domenzain, C., Mireles-Rodríguez, J.C., Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G. y Camarena, L. 2010. The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**. 192(23): 6230-6239.
- Takahashi, N., Mizuno, S., Hirano, T., Chevance, F.F.V., Hughes, K.T. y Aizawa, S.-I. 2009. Autonomous and FliK-dependent length control of the flagellar rod in *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**. 191(20): 6469-6472.
- Terashima, H., Koike, M., Kojima, S. y Homma, M. 2010. The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven *Vibrio* motor. **Journal of Bacteriology**. 192(21): 5609-5615.
- Terashima, H., Kojima, S. y Homma, M. 2008. Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagellar motor. **International Review of Cell and Molecular Biology**. 270: 39:85.
- Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S. y Homma, M. 2006. The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na<sup>+</sup>-driven flagellar and required for stator formation. **Molecular Microbiology**. 62(4): 1170-1180.
- Thomas, J., Stafford, G.P. y Hughes, C. 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101(11): 3945-3950.
- Thomas, D., Morgan, D.G. y Rosier, D.J. 2001. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. **Journal of Bacteriology**. 183(21):6404-6412.
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštaric', N., Economou, A. y Karamanou, S. 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. **Nature Reviews. Microbiology**. 15(1): 21-36.
- Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. y Elofsson, A. 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. **Nucleic**

- Acids Research.** 43(W1): W401-W407.
- Ueno, T., Oosawa, K. y Aizawa, S.-I. 1992. M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. **Journal of Molecular Biology.** 227(3): 672-677.
- Uehara, T., Dinh, T. y Bernhardt, T.G. 2009. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology.** 191(16): 5094-5197.
- Van Way, S.M., Hosking, E.R., Braun, T.F. y Manson, M.D. 2000. Mot protein assembly into the bacterial flagellum: a model based on mutational analysis of the *motB* gene. **Journal of Molecular Biology.** 297(1): 7-24.
- Vega-Baray, B., Domenzain, C., Rivera, A., Alfaro-López, R., Gómez-César, E., Poggio, S., Dreyfus, G. y Camarena, L. 2015. The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. **Journal of Bacteriology.** 197(5): 833-847.
- Végh, B.M., Gál, P., Dobó, J., Závodsky, P. y Vonderviszt, F. 2006. Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 345(1): 93-98.
- Wadhams, G.H. y Armitage, J.P. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology.** 5(12): 1024-1037.
- Wagenknecht, T., DeRosier, D.J., Aizawa, S. y Macnab, R.M. 1982. Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to filament structure. **Journal of Molecular Biology.** 162(1): 69-87.
- Wang, H., Ziesche, L., Frank, O., Michael, V., Martin, M., Petersen, J., Schulz, S., Wagner-Döbler, I. y Tomasch, J. 2014. The CtrA phosphorelay integrates differentiation and communication in the marine alphaproteobacteria *Dinoroseobacter shibae*. **BMC Genomics.** 15:130.
- Wang, S., Fleming, R.T., Westbrook, E.M., Matsumura, P. y McKay, D.B. 2006. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. **Journal of Molecular Biology.** 355(4): 798-808.
- Yakushi, T., Yang, J., Fukuoka, H., Homma, M. y Blair, D.F. 2006. Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H<sup>+</sup> - driven and Na<sup>+</sup> -driven motors in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology.** 188(4): 1466-1472.
- Yamashita, I., Hasegawa, K., Suzuki, H., Vonderviszt, F., Mimori-Kiyosue, Y. y Namba, K. 1998. Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. **Nature Structural Biology.** 5(2): 125-132.
- Yamamoto, S. y Kutsukake, K. 2006. FliT acts as anti-FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology.** 188(18): 6703-6708.
- Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D.G., DeRosier, D.J., Vonderviszt, F., Imada, K. y Namba, K. 2000. The bacterial flagellar cap as the rotatory promoter of flagellin self-assembly. **Science.** 290(5499): 2148-2152.

- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. y Namba, K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**. 424(6949): 643-650.
- Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T. y Homma, M. 2004. Multimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. **Journal of Biochemistry**. 135(1):43-51.
- Zan, J., Heindl, J.E., Liu, Y., Fuqua, C. y Hill, R.T. 2013. The CckA-ChpT-CtrA phosphorelay system is regulated by *quorum sensing* and controls flagellar motility in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. **PLoS One**. 8(6): e66346.
- Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T.S. y Khan, S. 1996. FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. **Journal of Molecular Biology**. 261(2): 195-208.
- Zhao, X., Zhang, K., Buquoi, T., Hu, B., Motaleb, M.A., Miller, K.A., James, M.E., Charon, N.W., Manson, M.D., Norris, S.J., Li, C. y Liu, J. 2013. Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 110(35): 14390-14395.
- Zhou, J., Sharp, L.L., Tang, H.L., Lloyd, S.A., Billings, S., Braun, T.F. y Blair, D.F. 1998a. Function of protonable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role of Asp 32 of MotB. **Journal of Bacteriology**. 180(10): 2729-2735.
- Zhou, J., Lloyd, S.A. y Blair, D.F. 1998b. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95(11): 6436-6441.
- Zhou, J. y Blair, D.F. 1997. Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. **Journal of Molecular Biology**. 273(2): 428-439.
- Zhou, J., Fazzio, R.T. y Blair, D.F. 1995. Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**. 251(2): 237-242.
- Zhu, S., Kumar, A., Kojima, S. y Homma, M. 2015. FliL associates with the stator to support torque generation of the sodium-driven polar flagellar motor of *Vibrio*. **Molecular Microbiology**. 98(1): 101-110.