



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL DE LA REGIÓN CARBOXILO
TERMINAL DE LA PROTEÍNA MOTF EN LA
ROTACIÓN DEL FLAGELO DE
RHODOBACTER SPHAEROIDES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

BRUNO MEZA LÓPEZ BAYGHEN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina



JUNIO DE 2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo de Tesis se llevó a cabo en el Depto. de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Se agradece la visión y el liderazgo de la Doctora Laura Camarena durante la realización de este proyecto.

Se agradecen la discusión y contribución intelectual de la Doctora Clelia Domenzain y el Doctor Sebastian Poggio.

Asimismo, se agradece el apoyo técnico de Aurora Osorio.

Se agradece también a los sinodales de este trabajo: el Doctor Diego Gonzalez-Halphen, el Doctor Rodolfo García Contreras, el Doctor Rafael Camacho y el Doctor Luis Servín, por sus contribuciones hacia mejorar este trabajo.

El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos de DGAPA UNAM (IN204614) y CONACyT 235996.

INDICE

INDICE	3
Tabla de Figuras	5
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
El flagelo bacteriano.....	8
Incorporación de unidades generadoras de torque al motor flagelar	12
Rhodobacter sphaeroides	12
El sistema estator de Rhodobacter sphaeroides	14
Justificación.....	18
Hipótesis	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Particulares.....	18
Materiales y métodos.....	20
Condiciones de Cultivo, Plásmidos y Cepas	20
Plásmidos y construcciones generadas en este trabajo	20
Ensayo de interacción por doble híbrido en levadura	24
Ensayos de nado.....	25
Cuantificación del halo de nado.....	26
Inmunodetección de fase sólida	26
Predicción de estructura terciaria de MotF	27
Identificación de hélice anfipática en MotF.....	27
Superposición de modelos de estructura terciaria.....	27
Predicción de regiones de hélice superenrollada.....	28
Evaluación de fluorescencia en células vivas	28
Resultados.....	29

En el ensayo de doble híbrido las interacciones observadas entre FlgT y otros componentes del estator probablemente dependen de la región carboxilo terminal de FlgT	29
Contribución de la región carboxilo terminal de FlgT al nado de <i>R. sphaeroides</i> .	33
Interacción directa entre la región carboxilo terminal de FlgT y el dominio de activación del factor de transcripción Gal4	34
Regiones discernibles en un modelo bio-informático de la estructura terciaria de MotF	36
Características presentes en MotF relacionadas a proteínas asociadas a motores	37
Participación de la región carboxilo terminal de MotF en la rotación del flagelo de <i>R. sphaeroides</i>	40
Discusión	43
Anexo I: Los Sistemas Tol-Pal y Exb-Ton	53
Referencias.....	61

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo canónico del flagelo bacteriano	9
Figura 2. Esquematización de un modelo de la rotación flagelar	11
Figura 3. Comparación estructural de flagelos propulsados por gradientes de Na ⁺ o H ⁺	16
Figura 4. Estructura terciaria y dominios de FlgT en <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30
Figura 5. Ensayo de interacción entre MotF y los dominios de FlgT.....	31
Figura 6. Ensayo de interacción entre el dominio carboxilo terminal de FlgT y los componentes del estator de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	32
Figura 7. Nado de cepas de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> en ausencia de la región carboxilo-terminal de FlgT.	34
Figura 8. Interacción entre el dominio carboxilo terminal de FlgT y el dominio de activación de Gal4.	35
Figura 9. Características identificadas en la región periplásmica de MotF. .	39
Figura 10. Formas trucas de MotF.	40
Figura 11. La región carboxilo terminal de MotF es esencial para su función y localización.	42
Figura 12. Sustitución en el par de residuos involucrados en la interacción MotA-FliG en <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51
Figura 13.- El sistema Tol-Pal.....	56
Figura 14 Esquema del transporte dependiente de TonB.....	60

Papel de la región carboxilo terminal de la proteína MotF en la rotación del flagelo de *Rhodobacter sphaeroides*

Bruno Meza López Bayghen

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Investigación Biomédica Básica en la Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

El flagelo es una estructura compleja que funciona como un motor rotatorio; este se puede dividir en dos mecanismos principales: una parte móvil, o rotor y una parte fija o estator. Trabajos originales en las bacterias modelo clásicas *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* ayudaron a definir una serie de componentes del flagelo, presentes en múltiples bacterias, que se pueden clasificar como “componentes canónicos”. Sin embargo, en años recientes, se han descrito una serie de elementos “no canónicos” presentes en otras bacterias. En *Rhodobacter sphaeroides* se han descubierto al menos tres de estos elementos no canónicos. Dos de estos elementos presentan homología con proteínas de otros organismos. Sin embargo, un tercer elemento la proteína MotF, carece por completo de proteínas homólogas. Para entender mejor el funcionamiento de esta proteína, en este trabajo se caracterizó la interacción entre MotF y la proteína FlgT, la cual es otro componente del estator del flagelo de *R. sphaeroides*. De manera paralela se hizo un análisis bio-informático para buscar características comunes entre esta proteína y otros componentes de motor. Nuestros resultados sugieren una similitud entre MotF y otras proteínas asociadas a motores, como TolA y TonB. Con base en esta similitud, se propuso que la región carboxilo terminal de MotF podría ser necesaria para favorecer su incorporación en la estructura flagelar. Experimentos de localización *in vivo* de una versión de MotF carente de la región C-terminal confirmaron esta hipótesis. A partir de estos resultados se propone una posible función para MotF.

Abstract

The bacterial flagellum is a complex nano-structure that functions as a rotary motor. Because of this, it can be divided in two structural components: a moving part, known as rotor and a static part, known as stator. Classic works in the model organisms *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* allowed the description of a series of flagellar components present in most bacteria, referred to as “canonical” elements. However, in recent years, several “non-canonical” flagellar components, that is to say, elements present only in a small subset of bacteria, have been discovered. At least three of these non-canonical elements have been described in the stator of the model organism *Rhodobacter sphaeroides*. Two of the recently described elements seem to be homologous to previously described proteins. However, a third element, MotF, appears to completely lack homologues, making it an intriguing target for microbiology research. To increase our understanding of this protein, we attempted to characterize its interaction with another, more studied component of the *R. sphaeroides* flagellum: FlgT. Additionally, we used a bio-informatic approach to look for characteristics shared between MotF and other motor proteins. Our results suggest a similarity between MotF and other motor-associated proteins, such as TolA or TonB. Based on this similarity, we proposed the C-terminal domain might be necessary for MotF incorporation into the flagellar structure. The expression *in vivo* of a mutant version of MotF lacking the C-terminal domain revealed an aberrant localization of MotF. From these results a possible role for MotF is proposed.

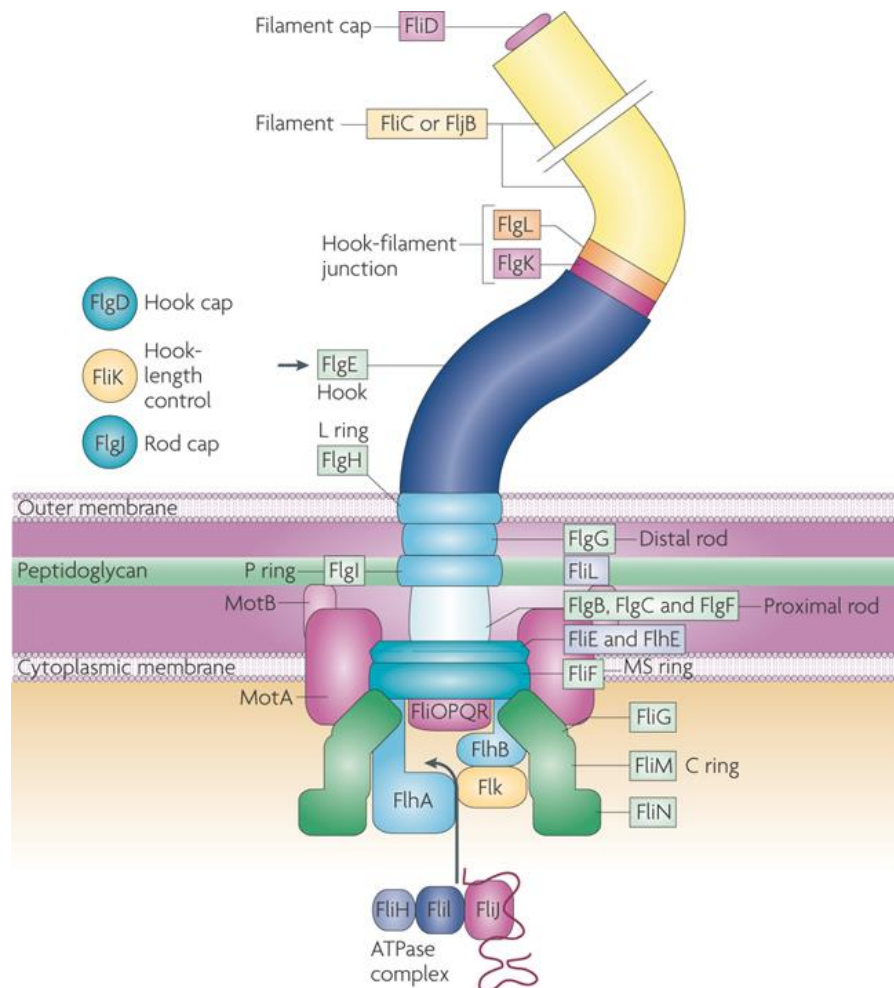
INTRODUCCIÓN

El flagelo bacteriano

El flagelo bacteriano es una nano-máquina biológica que funciona como un motor rotatorio. Éste se puede dividir en dos componentes: un rotor y un estator. El rotor se compone de una serie de anillos embebidos en la membrana acoplados al eje, y un estator, que son una serie de complejos anclados a la pared que proveen la fuerza para la rotación de rotor. El rotor se conecta a través de un gancho flexible con el filamento helicoidal rígido. Tanto el gancho como el filamento representan la porción extracelular del flagelo. La rotación del filamento helicoidal desplaza líquido, lo que genera la propulsión del cuerpo de la bacteria (revisado en [1]). Un modelo clásico del flagelo bacteriano de bacterias Gram negativas se muestra en la figura 1.

El rotor, también conocido como cuerpo basal, está compuesto por una serie de anillos cada uno integrado por una o varias proteínas acomodadas en multímeros resultando en estructuras anulares [2] (figura 1). Estos anillos han sido nombrados por su posición respecto a la envoltura celular. El anillo que se encuentra en el citoplasma se denomina “anillo C”; el anillo embebido en la membrana interna “anillo MS”, el anillo embebido en la pared de peptidoglicano “anillo P”, y el anillo embebido en la membrana externa “anillo L”. Una lista de los componentes proteicos de cada anillo se presenta en la figura 1.

El estator se encarga de generar la fuerza necesaria para el movimiento del flagelo [3]. La fuerza se origina en los complejos conocidos como unidades generadoras de torque, conformados por las proteínas MotA y MotB. La denominación de estas proteínas obedece al hecho de que mutaciones en los genes *motA* y *motB* provocan un fenotipo Mot⁻, es decir, las células mutantes no son móviles [4]. Cada unidad generadora de torque está compuesta por 4 subunidades de la proteína MotA y dos subunidades de la proteína MotB [5].



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1. Modelo canónico del flagelo bacteriano

Esquema de los componentes proteicos del flagelo bacteriano. Se representa la maquinaria de exportación (compuesta por FliH, FliI, FliJ, FlhA, Flk, FlhB, y FliO, FliP, FliQ, FliR), los anillos C (compuesto por FliG, FliM, FliN), MS (compuesto por FliF, FliE y FlhE), P (compuesto por FliI) y L (compuesto por FlgH). Asimismo, se esquematizan los compuestos estatores (formados por las proteínas MotA y MotB). Finalmente, se muestra el eje central (compuesto FlgB, FlgC, y FlgF), el gancho (compuesto por la proteína FlgE) la unión del gancho y el filamento (compuesto por FlgL y FlgK), el filamento (compuesto por una o varias flagelinas, en este caso se muestran FliC y FljB) y por último la proteína de coronamiento (formado por la proteína FliD) [Tomado de [2]].

MotA es una proteína integral de membrana que se compone de cuatro cruces transmembranales y un asa citoplásmica que interactúa con la proteína flagelar FliG, ubicada en la base del flagelo (componente del anillo C, ver figura 1). MotB presenta un cruce transmembranal y una región periplásmica dentro de la cual se encuentran un dominio de unión a la pared de peptidoglicanos y una hélice anfipática justo después del cruce transmembranal. Las hélices transmembranales de las proteínas MotA y MotB forman un canal, que permite el flujo de protones del espacio periplásmico al espacio citoplásmico. La energía generada por la translocación de protones produce la fuerza que eventualmente produce el giro del rotor. Algunas especies que viven en condiciones ricas en sodio, como el agua de mar, presentan unidades generadoras de torque que utilizan sodio en este proceso. A las proteínas homólogas a MotA y MotB que forman este tipo de unidades dependientes de sodio, se les denomina PomA y PomB, respectivamente [6].

Las unidades generadoras de torque tienen dos funciones principales. La primera es la de proveer un punto de ancla a partir del cual se genere la fuerza para impulsar el flagelo, esto se logra a través de un dominio de unión a peptidoglicano presente en la región periplásmica globular de MotB [7]. La otra función es la de generar fuerza. Para ello, hacen uso de la energía contenida en el gradiente electroquímico de protones. Dos hélices transmembranales de MotA, y la única hélice transmembranal de MotB, forman el canal permeable a protones [8]. La apertura de este canal es regulada por una pequeña hélice anfipática que se ha denominado tapón [9]. Si este tapón se encuentra abierto, es decir, no interaccionando con el lumen del canal, los protones entran y se unen a un residuo conservado de ácido aspártico en la hélice transmembranal de MotB [10]. La protonación de este residuo induce un cambio conformacional [11], que permite al asa citoplásmica de MotA establecer una interacción con FliG. La interacción entre MotA y FliG desplaza al rotor por un "paso" [12]. Al deprotonarse el residuo de ácido aspártico, se da un segundo cambio conformacional [11], en el cual MotA libera a FliG, completando otro "paso" en la rotación [12]. A través de estos pasos consecutivos se logran generar ciclos completos de rotación (figura 2).

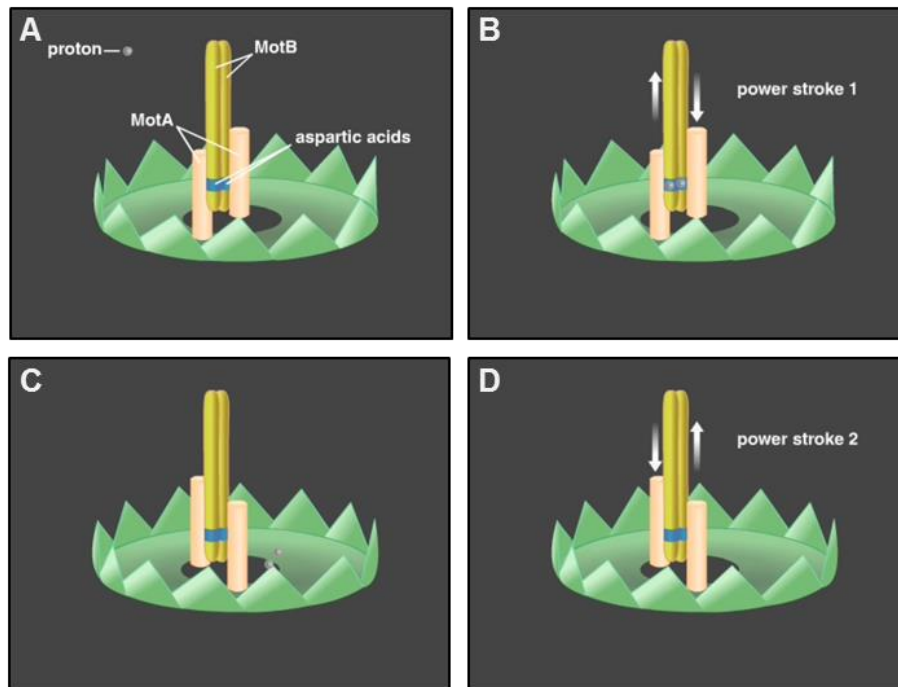


Figura 2. Esquemática de un modelo de la rotación flagelar

En esta figura se muestra una serie de esquemas (adaptados de un recurso audiovisual parte de [13]) que pretenden ilustrar los pasos en la rotación flagelar. En el panel 1 se señalan los elementos esquematizados. Se muestra una unidad generadora de torque, compuesta por MotA y MotB, y se señalan los residuos de ácido aspártico que permiten el flujo de protones. Se representa un protón como una esfera. Finalmente, se muestran las asas de las unidades repetitivas de FliG como triángulos. En el panel B se muestra el cambio conformacional que sucede cuando se protonan los residuos de ácido aspártico, resultando en un cambio en la interacción entre la región citoplásmica y el asa de FliG. En el panel C se muestra la de-protonación y en el panel D, el cambio conformacional que resulta de esta de-protonación. (El video completo se puede encontrar en http://www.garlandscience.com/garlandscience_resources/resource_detail.jsf?landing=student&resource_id=9780815341055_CH14_QTM06)

Incorporación de unidades generadoras de torque al motor flagelar

En *Escherichia coli*, el sistema estator se compone exclusivamente de MotA y MotB [5]. Se ha propuesto que MotB se encarga de mediar la asociación de los complejos MotAB con el rotor flagelar a través de su interacción con la pared de peptidoglicano y con FlgI, la proteína del anillo P [14]. Por su parte MotA también contribuye a la asociación de los complejos, a través de su interacción con FliG; esta interacción tiene como función principal la transducción de la fuerza generada por el flujo protón motriz a la rotación del flagelo [15]. Hasta hace relativamente poco, se creía que estas dos proteínas (o sus homólogos) eran necesarias y suficientes para generar la rotación del flagelo en todas las bacterias. Sin embargo, conforme avanza la investigación sobre la diversidad presente en los sistemas motiles bacterianos, empezamos a entender que este puede no siempre ser el caso.

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides es una alfa proteobacteria de vida libre púrpura no sulfurosa de gran diversidad metabólica. Las alfa proteobacterias son una clase de bacterias particularmente diversa [16]. Entre los miembros de esta clase se encuentran varias especies de gran interés en la investigación en bio-energética, entre ellas, la familia de las Rhodobacteraceas. Tal como su nombre sugiere, el distintivo de esta familia está en la producción de pigmentos rojos, morados o púrpuras. Estos pigmentos son esenciales para la fotosíntesis que sucede en la membrana de estas bacterias, y que las provee de energía. Sin embargo, se distinguen como “no sulfurosas” porque a diferencia de otras especies de bacterias púrpuras fotosintéticas, el aceptor final de electrones que utilizan las bacterias del género *Rhodobacter* es el oxígeno, no el azufre. *Rhodobacter sphaeroides* es particularmente interesante ya que, dentro de su capacidad fotosintética, se puede alimentar tanto de manera fotoautófica como fotoheterotrófica. A esto se suma su

capacidad de hacer respiración aeróbica y anaeróbica aunado a su capacidad de fijar nitrógeno [17]. Es a esto lo que se refiere el término de “gran diversidad metabólica”.

Otra característica interesante de *R. sphaeroides* es su genoma particularmente grande. Por ejemplo, el genoma de la cepa WS8 de *R. sphaeroides* contiene un cromosoma grande de 3.14 Mbp, un cromosoma “pequeño” de 0.97 Mbp y dos plásmidos, de 200 y 110 kbp [18]. Estos elementos genómicos se encuentran presentes con cierta similitud en las diferentes cepas aisladas de *R. sphaeroides*, siendo los plásmidos los elementos más variables. Por ejemplo, la cepa ATCC_17029 posee solo un plásmido, mientras que las cepas 2.4.1 y ATCC_17025 tienen cinco [19]. Lo interesante de estos genomas no es solo su tamaño, si no la presencia de múltiples copias de ciertos elementos como genes, operones, o incluso loci enteros, que pueden no necesariamente ser redundantes [20]. Es decir, *R. sphaeroides* parece haber incorporado a su genoma múltiples elementos que utiliza en distintas situaciones. Un caso interesante de este fenómeno son los dos sistemas flagelares de *R. sphaeroides*.

Rhodobacter sphaeroides posee dos sistemas flagelares [21]. Estos se denominan sistema I y sistema II. Estos dos sistemas fueron nombrados así por el orden histórico de su descubrimiento. El sistema flagelar I es el que *R. sphaeroides* utiliza en las condiciones de crecimiento comunes en laboratorio [21]. Este conjunto de genes es responsable de la formación un único flagelo, de localización subpolar. Por su parte, el sistema II se expresa seleccionando mutantes (pseudorevertantes), incapaces de expresar el sistema I o, según se ha propuesto recientemente, en presencia de algunos nutrientes, como mezclas de aminoácidos. Los productos codificados por los genes del sistema II dan lugar a la formación de varios flagelos de localización polar [21].

El sistema flagelar I no es el sistema endógeno de *R. sphaeroides*, ya que diversos análisis filogenéticos indicaron que este sistema es resultado de un evento de transferencia horizontal [21]. A nivel de secuencia, los genes del sistema 1, son altamente similares a los genes flagelares de las gamma-proteobacterias.

Por su parte, los genes del sistema II son similares a los de las alfa-proteobacterias, siendo este sistema el endógeno [21].

En sí mismo, el hecho de que el sistema flagelar I de *R. sphaeroides* sea resultado de un evento de transferencia horizontal es interesante. En teoría, esto nos podría permitir evaluar cómo ha evolucionado un sistema original de una clase de bacterias, sometido a las presiones de selección de las condiciones de vida de otra clase. Más allá de esto, el sistema I de *R. sphaeroides* empieza a surgir como un excelente modelo para estudiar la diversidad en el flagelo bacteriano. Esto debido a que contiene una serie de genes flagelares con un bajo o nulo grado de homología con otras proteínas. Algunos de estos componentes en particular han resultado tener una función sobre el funcionamiento del sistema estator.

El sistema estator de Rhodobacter sphaeroides

En el flagelo I de *Rhodobacter sphaeroides*, existen al menos 3 componentes no canónicos involucrados en el funcionamiento del estator flagelar: FliL, MotF y FlgT [22-24].

FliL es una proteína que tiene un cruce transmembranal cerca del extremo NH₂ terminal. Esta proteína se encuentra conservada en bacterias y su función ha permanecido sin ser totalmente clarificada dado que en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* su ausencia no afecta el nado de la bacteria. No obstante en 2008, se observó que la ausencia de FliL afectaba la capacidad de desplazamiento en superficies semi-sólidas [25]. En contraste, en *Caulobacter crescentus*, *Silicibacter* TM1040 y *R. sphaeroides* la ausencia de FliL provoca fenotipo Mot⁻, lo que quiere decir que en estas cepas mutantes el flagelo se sintetiza pero es incapaz de rotar. Por lo anterior, se dedujo que esta proteína está involucrada en el proceso que da lugar a rotación del flagelo [22, 26]. En *R. sphaeroides* fue reportado que el fenotipo Mot⁻ provocado por la ausencia de *fliL* puede ser suprimido por mutaciones secundarias en *motB*. Dichas pseudorevertantes llevan una mutación en la región del tapón de MotB. Mutaciones en esta zona se han

asociado a un estado permeable continuo de los canales MotAB [9]. Por lo anterior se cree que FliL podría participar en la activación del canal de protones.

MotF es una proteína con un solo cruce transmembranal, exclusiva de *R. sphaeroides*. Esto representa un reto interesante, ya que en biología se hace uso extensivo del estudio de la homología para proponer posibles funciones de proteínas desconocidas. Por medio de estudios genéticos, se determinó que MotF es esencial para la rotación del flagelo [24]. La delección de MotF genera un fenotipo Mot. Dicho fenotipo puede ser suprimido por mutaciones secundarias en *motB*, de forma similar a la supresión observada para las cepas Δ *fliL* [24]. Así, se puede inferir que MotF juega un papel en el funcionamiento de los complejos MotAB, aunque no podamos decir exactamente cuál es este papel.

FlgT es una proteína periplásmica que forma parte del anillo H, una estructura del cuerpo basal flagelar localizada entre la pared de peptidoglicano y la membrana celular externa. Esta estructura no es común a todos los flagelos bacterianos. De hecho, antes de su descripción en *R. sphaeroides*, se creía que el anillo H era exclusivo de flagelos propulsados por gradientes de sodio. Un esquema de las diferencias estructurales entre flagelos propulsados por sodio y por protones se presenta en la figura 3.

La existencia de FlgT, su presencia como componente del anillo H, así como su función fueron descritas originalmente en la bacteria marina *Vibrio alginolyticus* [27]. En abril del 2013, el grupo de Katsumi Imada publicó la estructura tridimensional de FlgT de *Vibrio alginolyticus* [28]. En el modelo de la estructura tridimensional se pueden apreciar tres dominios claramente delimitados. Por su posición dentro de la proteína, estos dominios fueron denominados amino (N), medio (M), y carboxilo (C). Estos dominios están compuestos principalmente por hojas beta, separados por regiones no estructuradas [28].

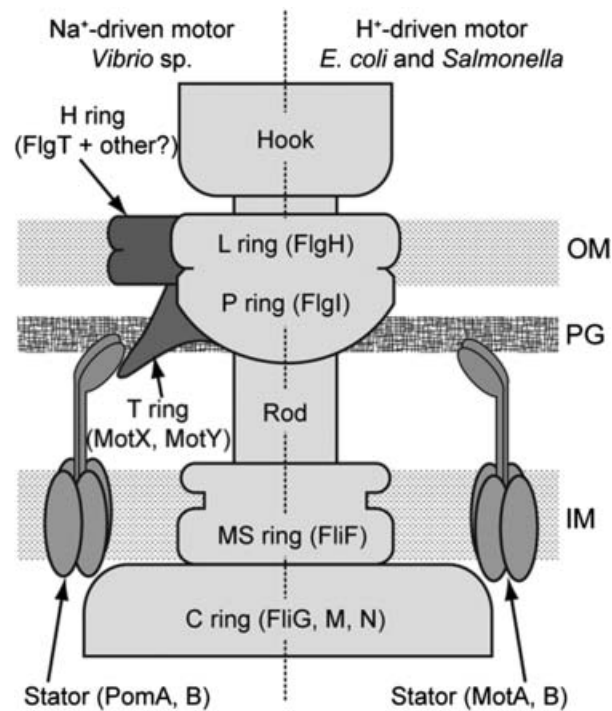


Figura 3. Comparación estructural de flagelos propulsados por gradientes de Na^+ o H^+

Representación gráfica de datos obtenidos por microscopía electrónica de la estructura del cuerpo basal de flagelos propulsados por iones sodio (como las de especies de *Vibrio*), mostradas a la izquierda, o de flagelos propulsados por protones (como los de *E. coli* y *S. enterica*), mostrados a la derecha. Se enfatizan el anillo H y el anillo T. Estas dos estructuras están presentes en los flagelos propulsados por gradientes de iones de sodio y ausentes en los flagelos propulsados por gradientes de protones.

FlgT juega un papel tanto en la estructura como en la función del flagelo de *V. alginolyticus*. La delección de FlgT en esta resulta en una cepa con motilidad reducida y con flagelos que se desprenden. El conocimiento de que FlgT consta de tres dominios ayudó a determinar que la función de FlgT en la rotación del flagelo de *V. alginolyticus* resulta de la interacción entre su dominio medio y las proteínas accesorias del estator MotX y MotY [28]. MotX y MotY a su vez se encargan de reclutar complejos estatores a la base del flagelo [29].

FlgT juega un papel en el funcionamiento del estator en *V. alginolyticus* y en *R. sphaeroides*. Sin embargo, el mecanismo a través del cual FlgT promueve la rotación del flagelo de *V. alginolyticus* depende de dos proteínas: MotX y MotY

[28]. En *R. sphaeroides*, no se han descrito homólogos para MotX ni para MotY. Eso, aunado al hecho de que la secuencia de aminoácidos identificada como FlgT en *R. sphaeroides* presenta tan solo un 17% de similitud con la secuencia de FlgT en *V. alginolyticus* [23], sugiere que la divergencia entre estas dos proteínas podría ser tal, que la función no sea la misma.

Existen tres líneas de evidencia que muestran una interacción entre MotF y FlgT. La primera es una interacción observada por medio del ensayo de doble híbrido en levadura. En este ensayo, la expresión de genes que corrigen dos tipos de auxotrofia, a histidina y a adenina depende de la fuerza con la que las dos proteínas analizadas interaccionen. Al evaluar por este ensayo a FlgT y a MotF se puede observar que la región periplásmica de MotF interacciona con FlgT de manera débil, solo lo suficiente para corregir la auxotrofia de histidina, que es la de menor astringencia en dicho ensayo [23]. Por otra parte, si se observa una forma quimérica fluorescente de MotF, ésta se presenta como un único foco fluorescente en la base del flagelo [24]. En ausencia de FlgT, este punto se disipa [23]. Finalmente se sabe que MotF se asocia de manera estable a los complejos del cuerpo basal flagelar. Esto porque al purificar cuerpos basales de la cepa WS8 (silvestre), la señal de MotF se puede detectar por inmunodetección de fase sólida, mas no así en los cuerpos basales de una cepa $\Delta flgT$ [23]. Entonces, sabemos que la asociación de MotF al motor flagelar depende de FlgT, y que esto podría ser debido a una interacción directa.

Aparte de su interacción con MotF, FlgT interacciona con MotB y FliL [23]. Por lo tanto, es difícil discriminar cual es la participación de FlgT en el nado según su interacción con cada uno de estos componentes. Por lo tanto, en este trabajo, decidimos analizar los dominios independientes de FlgT y probar su interacción con las proteínas flagelares FliL, MotB, y especialmente con MotF.

Por otro lado, en este trabajo también se realizó una predicción de la estructura terciaria de MotF con el fin de obtener versiones mutantes de MotF carentes de regiones estructurales definidas. La funcionalidad de estas versiones mutantes fue probada *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

El flagelo es una maquinaria biológica de inmensa complejidad. Para poder entender esta estructura es necesario explorar comparativamente la diversidad entre distintas especies. En este sentido una especie que resulta particularmente interesante es *Rhodobacter sphaeroides*. Este organismo modelo y ampliamente estudiado, presenta distintos componentes únicos a su especie. Estudiar estos componentes nos permitirá entender mejor el panorama evolutivo de esta fascinante maquinaria molecular. Es por eso que el propósito de este trabajo fue el explorar con más detalles uno de los elementos únicos del flagelo de *R. sphaeroides*: La proteína MotF.

HIPÓTESIS

MotF y FlgT interaccionan a través de un dominio discreto en cada proteína. Esta interacción es necesaria para el correcto funcionamiento del flagelo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar dominios en FlgT y MotF relevantes para su función y/o interacción.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Hacer un análisis bio-informático de las regiones presentes en FlgT de *Rhodobacter sphaeroides*.
2. Generar construcciones plasmídicas que permitan la expresión en levadura de formas truncas de FlgT, y evaluar su capacidad de interacción con otros componentes del estator flagelar (FliL, MotB, y MotF) en un ensayo de doble híbrido.
3. Evaluar la posible influencia de las regiones identificadas (en los ensayos mencionados en el punto 2) sobre el nado de *Rhodobacter sphaeroides*.

4. Hacer un análisis bio-informático de las regiones presentes en MotF de *Rhodobacter sphaeroides*.
5. Generar construcciones que permitan la expresión en levadura de formas truncas de MotF para evaluar su capacidad de interacción con otros componentes del estator flagelar, en particular con FigT, en un ensayo de doble híbrido.
6. Evaluar la posible influencia de las regiones identificadas (en los ensayos mencionados en el punto 5) sobre el nado de *Rhodobacter sphaeroides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de Cultivo, Plásmidos y Cepas

La lista de plásmidos utilizados en este estudio se presenta en la tabla 1. *Rhodobacter sphaeroides* WS8 se creció en medio mínimo de Siström [30] a 30°C en la oscuridad con una agitación de 200 rpm. *Escherichia coli* TOP10 se creció en medio LB [31] a 37°C. Los ensayos de nado se llevaron a cabo a 30°C en la oscuridad en placas de nado con medio mínimo de Siström y con las concentraciones de agar marcadas para cada experimento. Cuando fue requerido, se añadieron antibióticos a las concentraciones siguientes: kanamicina a 25 µg/ml, tetraciclina a 1 µg/ml y espectinomomicina a 50 µg/ml para *R. sphaeroides* y kanamicina a 50 µg/ml, tetraciclina a 10 µg/ml, espectinomomicina a 50 µg/ml y ampicilina a 100 µg/ml para *E. coli*. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 se creció a 30°C en medio a YPDA (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa y 0.003% de adenina) o medio sintético SD (Clontech) carente de ya sea adenina, histidina, leucina y triptófano, según sea indicado en el pie de figura.

Plásmidos y construcciones generadas en este trabajo

Los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 1. Para los ensayos de doble híbrido se amplificaron y clonaron formas truncas de FlgT. Para la amplificación de las formas truncas de FlgT que contienen la región amino (N) y la región amino unida a la región media (NM), se utilizó el oligonucleótido forward 6086 DH fw (que elimina los primeros 23 residuos de FlgT correspondientes al péptido señal) y los oligonucleótidos reverse FlgTBDnRv y FlgTBDnmRv, respectivamente. En estos oligonucleótidos se introdujo un codón de paro cambiando una base dentro de la región de hibridación del cebador; dicha posición se encuentra indicada, para cada caso, en la Tabla 2. Para la amplificación de las

formas truncas de FlgT que contienen la región carboxilo, (C) y la región media unida a la región C, (MC) se usó el oligonucleótido reverse 6086 DH Rv y los oligonucleótidos forward FlgTmcFw y FlgTcFw respectivamente. Los productos de amplificación de estas reacciones se clonaron en el vector pGBKT7 [32], río abajo y en fase con la región codificante del dominio de unión a DNA de Gal4.

Para expresar la forma trunca de FlgT sin el carboxilo terminal en *R. sphaeroides*, se amplificó la región codificante de FlgT, hasta el codón que codifica para la cisteína 287, el cual se reemplazó por un codón de paro. Para la amplificación de la forma trunca de FlgT se utilizó el oligonucleótido forward pRK6086F y el oligonucleótido FlgTBDnmRvEco. El producto de esta amplificación se clonó primero al vector de clonación pTZ19R [33]. De ahí, se subclonó al vector de expresión pRK415 [34].

Para expresar las formas truncas de MotF fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP), se clonaron las regiones codificantes de las formas truncas de esta proteína en un derivado del vector de clonación pTZ19R que contiene la región codificante de GFP. Para la amplificación de las formas truncas de MotF sin la región carboxilo terminal, se utilizó el oligonucleótido forward 0067 fwd (fase GFP-M) XbaI y los oligonucleótidos reverse MotF213Rv y MotF200Rv para las formas ΔK y ΔG , respectivamente. Las formas truncas se digirieron con XbaI y EcoRI, y se clonaron río abajo de la región codificante de la *gfp*. Los fragmentos que contenían cada una de las formas fusionadas se liberaron con una digestión con HindIII y EcoRI. Estos fragmentos se subclonaron en el vector de expresión pRK415.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente o Referencia
pCR2.1	Vector de clonación Amp ^r Kan ^r	Invitrogen
pGADT7	Vector de expresión del dominio de activación de Gal4 en levadura.	Clontech
pGADT7-MotF	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de activación de Gal4 con la región periplásmica de MotF	[24]
pGADT7-MotB	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de activación de Gal4 con la región periplásmica de MotB	[22]
pGADT7-FliL	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de activación de Gal4 con la región periplásmica de FliL	[22]
pGBKT7	Vector de expresión del dominio de unión a DNA de Gal4 en levadura.	Clontech
pGBKT7-FlgT	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de unión al DNA de Gal4 con la región periplásmica de FlgT	[23]
pGBKT7-FlgTn	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de unión al DNA de Gal4 con la región amino terminal de FlgT	Este trabajo
pGBKT7-FlgTnm	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de unión al DNA de Gal4 con la región amino terminal y media de FlgT	Este trabajo
pGBKT7-FlgTmc	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de unión al DNA de Gal4 con la región carboxilo terminal y media de FlgT	Este trabajo
pGBKT7-FlgTc	Vector de expresión de la proteína de fusión del dominio de unión al DNA de Gal4 con la región	Este trabajo

	carboxilo terminal y media de FlgT	
pTZ19R	Vector de clonación Amp ^r derivado de pUc	Pharmacia
pTZ19R-FlgTΔC	Vector de clonación con la región codificante de FlgT sin el dominio carboxilo terminal	Este trabajo
pTZ19R-GFPMotF	Vector de clonación con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 247 aminoácidos de MotF.	[24]
pTZ19R-GFPMotFΔK	Vector de clonación con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 213 primeros aminoácidos de MotF.	Este trabajo
pTZ19R-GFPMotFΔG	Vector de clonación con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 200 primeros aminoácidos de MotF.	Este trabajo
pRK415	Vector de expresión para bacterias Gram-negativas bajo el P Lac Tet ^r	[34]
pRK415-FlgT	Vector de expresión con la región codificante para los 361 aa de FlgT	[23]
pRK415-FlgTΔC	Vector de expresión con la región codificante de FlgT sin los últimos 88 aminoácidos.	Este trabajo
pRK415-GFPMotF	Vector de expresión con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 247 aminoácidos de MotF.	[24]
pRK415-GFPMotFΔK	Vector de expresión con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 213 primeros aminoácidos de MotF.	Este trabajo
pRK415-GFPMotFΔG	Vector de expresión con la región codificante de la proteína de fusión de GFP con los 200 primeros aminoácidos de MotF.	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia
8086 DH fw	CGGAATTC GCCGTCCGGGT CGAGGCCGA
6086 DH Rv	CGCTGCAG GCCGGCCGGTCTCCACGA ACTGC
FlgTBDnRv	CGCTGCAG CGTGCGCACCGG <u>T</u> CAGAG
FlgTBDnmRvEco	GCGAATTC GGCGGGGCTC <u>I</u> CAGCCCG
FlgTBDmcFw	GCGAATTC CCCGGTGCGCACGCTGATC
FlgTBDcFw	GCGAATTC GGCTGCGAGCCCGCCTCG
FlgTBDnmRvEco	GCGAATTC GGCGGGGCTC <u>I</u> CAGCCCG
0067 fwd (fase GFP-M) XbaI	GCTCTAGA ACGGAAGAGACCGACGACCC
0067Rvs-GFP EcoRI	CGGAATTC TCACGGATAACGGATCGGAT
MotF213Rv	GCGAATTC CTTCGCCGCGGGCT <u>A</u> GCGCGC
MotF200Rv	GCGAATTC GCGGATCT <u>A</u> CGGGCTCGCTGC

Notas a la tabla 2: Letra negrita indica el sitio de restricción adicional; Cursiva subrayada: indica la base que se encuentra sustituida para generar un codón de paro.

Ensayo de interacción por doble híbrido en levadura

Transformación de levaduras

Se sembró un cultivo de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 en medio YPDA y se dejó crecer hasta llegar a fase estacionaria. En fase estacionaria, se sembraron 50 ml de YPDA a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm. Este cultivo se dejó crecer 4 horas hasta llegar a la fase exponencial (DO₆₀₀ de 0.5 a 0.6). Las células se centrifugaron a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 50 mL de agua. Este lavado se repitió tres veces, para asegurar que se hubiera removido todo el medio de cultivo. Las células se resuspendieron en 500 µL de una solución Tris 100 mM, EDTA 5mM y acetato de litio 100 mM pH

7.5 y se pasaron a un tubo de 1.5 mL. Las células se incubaron en esta solución en agitación durante 30 minutos a 30 °C. Posteriormente en un tubo nuevo se mezclaron 100 ng de cada plásmido deseado, 200 ng de DNA acarreador o inespecífico previamente desnaturalizado y 100 µL de la suspensión celular. Se agregaron 600 µL de solución de polietilenglicol al 40%, Tris 100 mM EDTA 5 mM y acetato de litio 100 mM. La pastilla celular se resuspendió cuidadosamente en esta solución y se dejó incubar en agitación durante 30 minutos a 30 °C. Al acabar este periodo de incubación se agregaron 70 µL de DMSO (grado biología molecular) y se dejó incubar 16 minutos a 42 °C. Cada cuatro minutos, los tubos se mezclaron por inversión. Pasado el tiempo de incubación a 42°C se centrifugaron los tubos durante 10 segundos a 13,200 rpm. Las células se resuspendieron en 1mL de medio sintético SD a 4 °C. Los tubos se centrifugaron durante 10 segundos a 13 200 rpm. El paquete celular se resuspendió y se sembró en una placa de medio sintético carente de leucina y triptófano de bacto agar al 1.5 %

Ensayo de interacción por corrección de auxotrofia

Las cepas transformadas con los plásmidos de interés se pusieron a crecer en medio sintético carente de leucina y triptófano. Al llegar a fase estacionaria, los cultivos se diluyeron a una D.O. de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se hicieron 4 diluciones seriales 1:10. Se sembró una gota de 6 µL de cada dilución en 3 placas de bacto-agar al 1.5%, una carente de leucina y triptófano, una carente de histidina, leucina y triptófano y una carente de adenina, histidina, leucina y triptófano. El crecimiento de las cepas se evaluó a los 12 días de haberse sembrado.

Ensayos de nado

Para realizar los ensayos de nado se sembraron células de las cepas a ser evaluadas en medio Sistrom líquido adicionado con los antibióticos necesarios y se dejaron crecer hasta fase exponencial. Se sembraron 5 µL del cultivo en fase exponencial en cajas de medio Sistrom con agar al 0.24%, 0.27% y 0.3%, según

se indica en las figuras. El nado se evaluó como la formación de un halo alrededor del punto de inoculación después de 48 de incubación a 30°C.

Cuantificación del halo de nado

Utilizando el programa ImageJ se trazó una circunferencia que abarcara toda el área del círculo formado por el halo de nado. El área del círculo trazado se utilizó como parámetro. Para compensar las diferencias entre cajas y entre fotos, todos los datos se expresan como porcentaje de nado con respecto al observado para la cepa control WS8.

Inmunodetección de fase sólida

Se centrifugó una alícuota de los cultivos en fase exponencial de las diferentes cepas utilizadas a 12,000 × g por 5 min. Se resuspendió el paquete celular en 200 µL de buffer de Laemmli [35]. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Posteriormente, fueron agitadas con una sonda de ultrasonidos con 3 pulsos de 10 segundos. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS a 25 mA. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, durante 1 h a 250 mA. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche en una solución de leche desgrasada en polvo al 1% disuelta en TBST (Tris 50 mM, NaCl 150 Mm, Tween 20 0.1% pH 8.0). Al acabar el periodo de bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TBS-T. Posteriormente se incubó una hora con un anticuerpo policlonal de ratón anti-MotF en una dilución 1:5000 en una solución de TBS-Tween 20 con leche desgrasada en polvo al 0.5%. Al finalizar la incubación con los anticuerpos, se hicieron 2 lavados de 10 minutos, seguido de un lavado de 15 minutos con 10 mL de solución TBS-Tween. Posteriormente se adicionó anticuerpo secundario. El anticuerpo anti-IgG de ratón, acoplado a fosfatasa alcalina se colocó en una solución de TBS-T a una dilución 1:40,000 y se dejó incubar durante una hora. Posteriormente, se hicieron 2 lavados de 15 minutos seguido de un lavado de 20

minutos. Posteriormente, se puso la membrana en contacto con el sustrato CDP-Star de AppliedBiosystems y se reveló la reacción de quimioluminiscencia mediante placas fotográficas.

Predicción de estructura terciaria de MotF

Para generar el modelo tridimensional de MotF se usó el servidor HHpred, parte de las herramientas bio-informáticas del Instituto Max-Planck para Biología del Desarrollo (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) [36].

Identificación de hélice anfipática en MotF

Para observar la geometría de la hélice corta al inicio de la región periplásmica de MotF se generó una “rueda helicoidal”, donde se acomodan los residuos según su posición en una proyección bidimensional de una alfa hélice. Para generar esta rueda se utilizó el servidor Pepwheel (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel>). Para calcular el momento hidrofóbico se usó el servidor HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

Superposición de modelos de estructura terciaria

El modelo de la estructura tridimensional del dominio III de TolA de *Pseudomonas aeruginosa*, determinada por cristalografía de rayos X se descargó de la base de datos del Protein Data Bank (PDB) (Código de identificación 1LR0). Usando el software PyMol (<https://www.pymol.org/>) se generó un alineamiento tridimensional.

Predicción de regiones de hélice superenrollada

Para determinar la presencia de hélices superenrolladas se utilizó el servidor de predicción de hélices superenrolladas del polo bioinformático de Lyon (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_lupas.html) [37]. Este servidor se basa en la periodicidad de los heptapéptidos que conforman típicamente las hélices superenrolladas. Estas presentan un residuo hidrofóbico seguido de cinco residuos hidrofílicos y un residuo hidrofóbico. Este patrón se repite. Conforme aumentan las repeticiones de este patrón aumenta la probabilidad de que una hélice examinada sea una hélice superenrollada [37].

Evaluación de fluorescencia en células vivas

Se colocaron muestras de cultivo en fase exponencial de cada condición experimental en un portaobjetos cubierto con una capa de gel agarosa 1% disuelta en medio Sistro. Se tomaron fotografías de epifluorescencia utilizando el objetivo 100X de un microscopio Nikon Eclipse 600 equipado con una cámara (CDD) Hamamatsu Orca. Todas las preparaciones se evaluaron con los mismos parámetros de exposición, ajustados según las condiciones en las que se observaba el patrón previamente descrito de localización en un solo foco flagelar en la cepa control que expresa la forma completa de MotF-GFP [24].

RESULTADOS

En el ensayo de doble híbrido las interacciones observadas entre FlgT y otros componentes del estator probablemente dependen de la región carboxilo terminal de FlgT

En este trabajo nos interesó el explorar la interacción previamente descrita entre FlgT y MotF. Para hacer esto, la visión global del trabajo fue la de analizar de manera bioinformática estas dos proteínas para determinar regiones discretas cuya interacción pudiera ser evaluada un ensayo de doble híbrido. Con este conocimiento, después, se podría explorar la función de estas interacciones *in vivo*, en *R. sphaeroides*. Con esta visión, comenzamos por analizar a la proteína FlgT.

A pesar de que existe un muy bajo grado de conservación de la secuencia primaria de FlgT de *R. sphaeroides* con respecto a las secuencias encontradas en algunas gamma-proteobacterias, se encuentran conservados dos residuos de cisteína, que delimitan cada uno de los dominios estructurales definidos a partir de la estructura cristalográfica de FlgT de *Vibrio alginolyticus*. Además, en el trabajo de Fabela de 2013 se observó que la estructura terciaria predicha para FlgT de *R. sphaeroides* se superpone prácticamente en su totalidad con la estructura de FlgT de *V. alginolyticus* [23]. Lo anterior nos llevó a suponer que sería válido el utilizar las cisteínas conservadas como límites naturales de los dominios estructurales, del mismo modo que en el estudio realizado en *V. alginolyticus*.

Las formas trucas de FlgT utilizadas en este estudio, así como los dominios en la estructura terciaria de FlgT, se esquematizan en la figura 4.

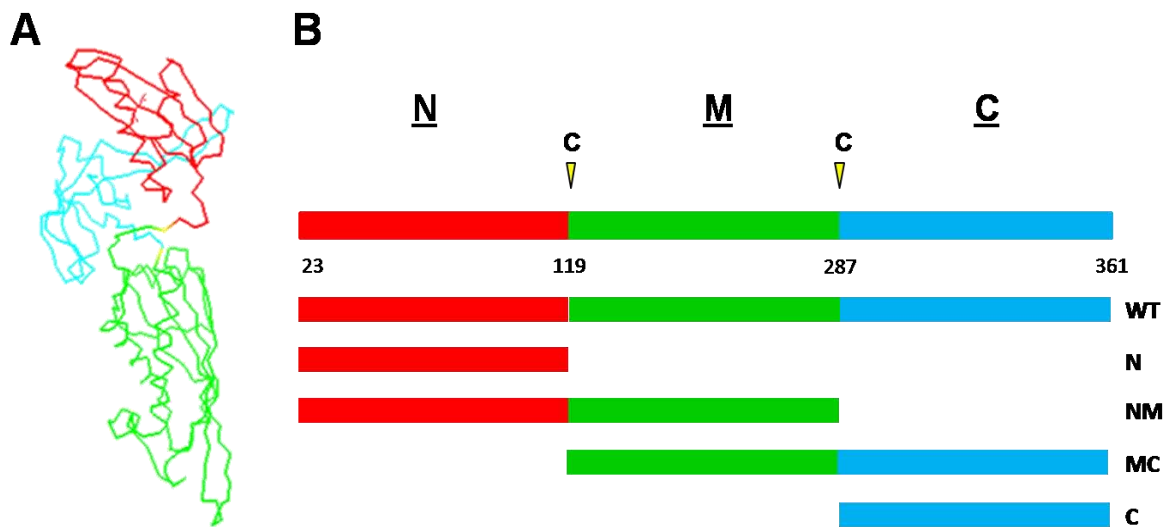


Figura 4. Estructura terciaria y dominios de FlgT en *Rhodobacter sphaeroides*.

A) Modelo de la estructura terciaria de FlgT generado por el servidor I-TASSER [Modificado de 14]. En rojo se muestra el dominio amino terminal (N), en verde el dominio medio (M) y en rojo el dominio carboxilo terminal (C). B) Esquema de las regiones consideradas para los ensayos de doble híbrido en este trabajo. Los dominios se marcan en los mismos colores que en el modelo tridimensional. La secuencia empieza a considerarse a partir del residuo 23, después del sitio de corte del péptido señal de FlgT. Se marca la posición de los residuos de cisteína C conservados utilizados para delimitar los dominios. Junto a cada una de las formas se muestra la abreviatura utilizada para denominar a cada forma trunca.

Se generaron las construcciones de los diferentes dominios de la proteína FlgT para su expresión en el plásmido de levadura pGBKT7. Una vez obtenidas y confirmadas dichas construcciones se probó, de primera instancia, la interacción entre el dominio amino (N), el dominio amino junto con el dominio medio (NM), el dominio medio junto con el dominio carboxilo (MC) y el dominio carboxilo (C) con la región periplásmica completa de MotF. Como se puede observar en la figura 5, la región periplásmica de MotF no interacciona con FlgT en el ensayo de doble híbrido en levadura.

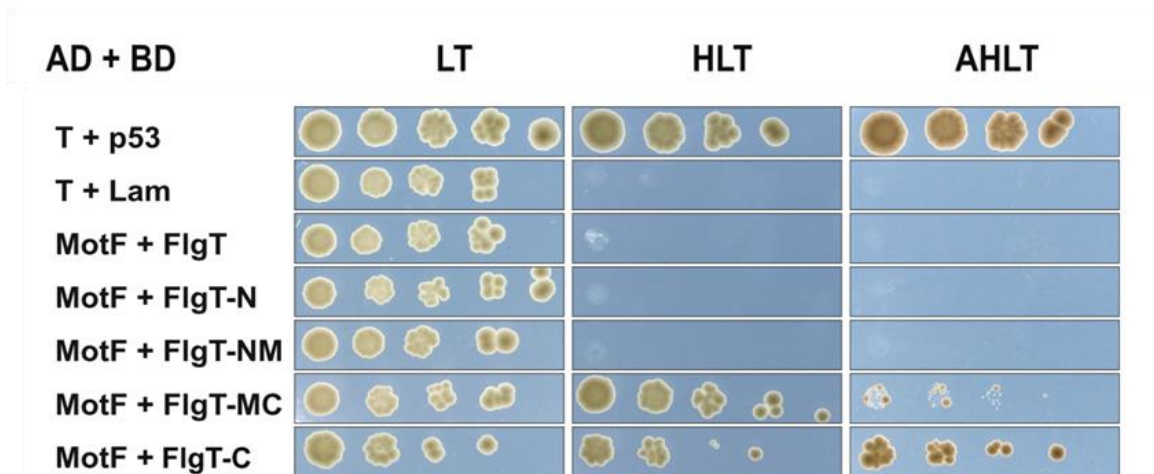


Figura 5. Ensayo de interacción entre MotF y los dominios de FlgT.

Ensayo de interacción de doble híbrido de levadura. La interacción se mide como la capacidad de crecimiento en medio sin histidina (HLT), o sin adenina e histidina (AHLT). En la parte izquierda se indican las proteínas que expresa cada cepa y el dominio al que se encuentran fusionadas. Se presenta la interacción entre el antígeno T y p53 como control positivo y la interacción entre el antígeno T y laminina como control negativo. (AD: Dominio de activación, BD: dominio de unión a DNA de Gal4, T: antígeno T, Lam: Laminina C).

A pesar de que previamente había sido reportada la interacción entre MotF y FlgT, ésta no ocurre con el dominio periplásmico completo (residuos 77-239), tal y como se confirmó aquí, sino con una versión de MotF que carece de 21 residuos ($\Delta 77-98$) proximales al segmento TM (transmembranal, el cual abarca los residuos 54-74) [23]. No obstante, se decidió probar el segmento periplásmico completo de MotF, en caso de que éste pudiera interactuar con un dominio aislado de FlgT. Como se observa en la figura 5, de primera instancia, esta parece ser la situación, ya que se observó una fuerte interacción (capaz de corregir la auxotrofia de adenina) entre las dos construcciones que expresan la región carboxilo terminal de FlgT (MC y C) y la región periplásmica de MotF.

Motivados por este descubrimiento, probamos la interacción de las formas trucas de FlgT con las regiones periplásmicas de MotB y FliL. Como se ve en la figura 6, la recuperación de la prototrofia tanto de histidina como de adenina se da en presencia de las formas trucas de FlgT que contienen el dominio carboxilo

terminal. Esto sugiere que el dominio carboxilo terminal de FlgT interacciona con MotF, FliL y MotB.

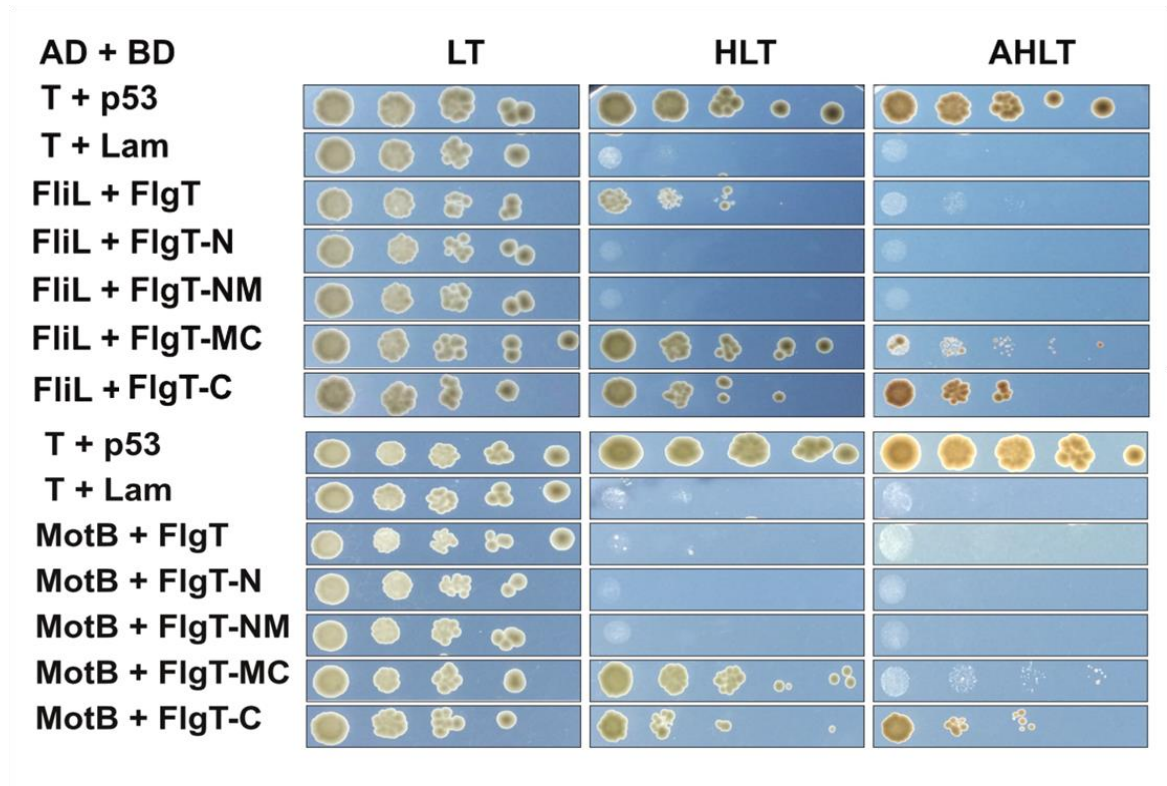


Figura 6. Ensayo de interacción entre el dominio carboxilo terminal de FlgT y los componentes del estator de *Rhodobacter sphaeroides*.

Ensayo de interacción de doble híbrido de levadura. La interacción se mide como la capacidad de crecimiento en medio sin histidina (HLT), o sin adenina e histidina (AHLT). En la parte izquierda se indican las proteínas que expresa cada cepa y el dominio al que se encuentran fusionadas. Se presenta la interacción entre el antígeno T y p53 como control positivo y la interacción entre el antígeno T y lámina como control negativo. (AD: Dominio de activación, BD: dominio de unión a DNA de Gal4, T: antígeno T, Lam: Lamina C).

Contribución de la región carboxilo terminal de FlgT al nado de *R. sphaeroides*

Para evaluar la participación del dominio carboxilo terminal de FlgT sobre el nado de *R. sphaeroides*, se procedió a generar una versión trunca de esta proteína sin la región carboxilo terminal. Dicha versión de *flgT* fue clonada en el vector pRK415. Este plásmido es estable en *R. sphaeroides*, presenta un número de copias moderado y permite la expresión del inserto clonado a partir del promotor *plac* [34].

Las células de *R. sphaeroides* $\Delta flgT$ no son mótils. Sin embargo, como se aprecia en la figura 7, al introducir el plásmido pRK415 expresando la forma silvestre de FlgT, se logra recuperar el 80% del nado de las células, lo cual es consistente con las observaciones publicadas [23]. Sin embargo, cuando se introdujo la forma trunca de FlgT sin la región carboxilo terminal (FlgT Δ C), solamente se recuperó 40% del nado. Para saber si el nado era afectado por la densidad del medio en el que se desplazaban las células, se probaron 3 diferentes concentraciones de agar.

En la figura 7A se puede observar que las cepas expresando la versión FlgT Δ C mantienen la capacidad de nado en las tres concentraciones de agar probadas, pero es posible apreciar cierta reducción del halo de nado. En la figura 7B se muestra la cuantificación del porcentaje de desplazamiento con respecto a WS8. En las tres densidades probadas, se mantiene la misma diferencia entre las cepas mutantes y la cepa silvestre. Esto sugiere que la región carboxilo terminal de FlgT es necesaria, mas no esencial, para el nado de *R. sphaeroides*. Alternativamente, es posible considerar que la estabilidad de la proteína FlgT Δ C fuese menor a la de la proteína completa, y ello diera lugar a una reducción en el diámetro del halo.

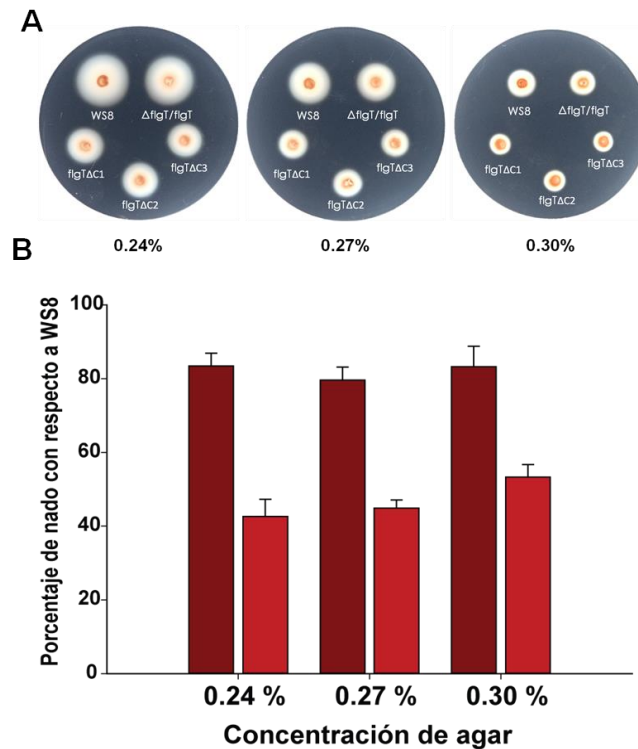


Figura 7. Nado de cepas de *Rhodobacter sphaeroides* en ausencia de la región carboxilo-terminal de FlgT.

A) Ensayos de nado en concentraciones crecientes de agar. Cepas mutantes en FlgT ($\Delta flgT::aadA$) se complementaron con la forma completa y la forma trunca sin el dominio carboxilo de FlgT (FlgT Δ C). En una misma caja de nado con la concentración de agar indicada se sembró la cepa WS8 (cepa silvestre), la cepa SF3 ($\Delta flgT::aadA$) complementada con la forma completa de FlgT, y tres parches independientes complementados con la forma trunca FlgT Δ C. Se muestran fotos representativas de tres repeticiones técnicas. B) Cuantificación del porcentaje del área ocupada por el halo de nado de las cepas complementadas con respecto al nado de la cepa silvestre. En rojo oscuro se muestra la cepa complementada con la forma completa, en rojo las cepas complementadas con la forma trunca.

Interacción directa entre la región carboxilo terminal de FlgT y el dominio de activación del factor de transcripción Gal4

Debido al hecho de que en el ensayo de interacción de doble híbrido se observó que la región carboxilo terminal de FlgT era capaz de interactuar con todas las proteínas flagelares probadas, mientras que *in vivo* la remoción de esta

región afectó solo parcialmente el nado de la bacteria, se decidió probar la interacción entre las proteínas quiméricas que contienen la región carboxilo terminal de FlgT y el dominio de activación del factor de transcripción Gal4. Como se observa en la figura 8, ambas proteínas quiméricas interaccionan con suficiente fuerza para corregir la auxotrofia de adenina.

Conviene hacer notar, que dado el crecimiento de las levaduras en los medios HLT y AHLT es posible considerar que existe una interacción mucho mayor entre el dominio de activación de Gal4 y el dominio C de FlgT, en relación al grado de interacción con el dominio MC. El mismo efecto se observa en el resto de las interacciones probadas (ver, Fig. 3 y 4). Por ello, sería posible considerar que el dominio M, o incluso los dominios N y M, oculten determinantes presentes en el dominio C que favorecen la interacción inespecífica.

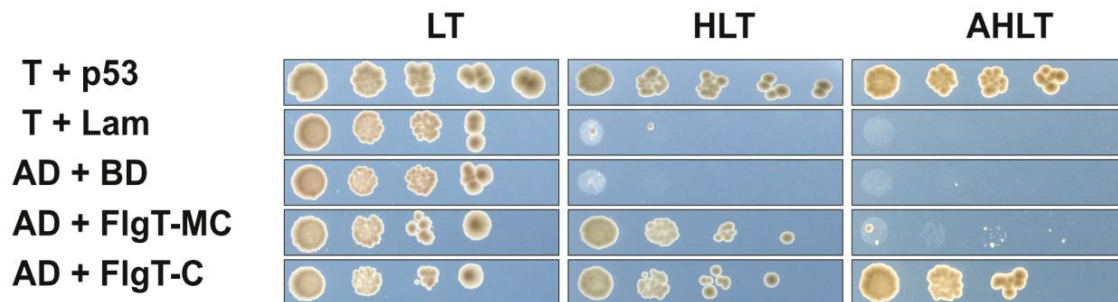


Figura 8. Interacción entre el dominio carboxilo terminal de FlgT y el dominio de activación de Gal4.

Ensayo de interacción de doble híbrido de levadura. La interacción se mide como la capacidad de crecimiento en medio sin histidina (HLT), o sin adenina e histidina (AHLT). En la parte izquierda se indican las proteínas que expresa cada cepa y el dominio al que se encuentran fusionadas. Se presenta la interacción entre el antígeno T y p53 como control positivo y la interacción entre el antígeno T y Laminina como control negativo (AD: Dominio de activación, BD: dominio de unión a DNA de Gal4, T: antígeno T, Lam: Laminina C).

En resumen, de estos ensayos se observó que ninguna de las proteínas flagelares probadas (i.e. MotB, FliL o MotF) fue capaz de interactuar con los dominios N, o NM de FlgT; mientras que la región carboxilo terminal de FlgT

interacciona fuertemente con el dominio de activación de Gal4, lo cual limita la posibilidad de estudiar esta región por medio de ensayos de doble híbrido.

Regiones discernibles en un modelo bio-informático de la estructura terciaria de MotF

MotF es una proteína integral de la membrana interna de *R. sphaeroides*, esencial para la rotación del flagelo 1 de esta bacteria [24]. Sin embargo, al no tener homólogos descritos, es casi imposible tratar de inferir o proponer una actividad o mecanismo por el cual cumpla su función en la rotación del flagelo. Como una aproximación para conocer más acerca de esta proteína, se decidió introducir la secuencia correspondiente al segmento periplásmico de esta proteína al servidor HHpred. Este servidor genera una predicción de la estructura tridimensional gracias a comparaciones de matrices resultado de alineamientos locales de alta sensibilidad. El modelo de la región periplásmica de MotF se presenta en la figura 9A. Se pueden identificar 4 regiones con características particulares que las hacen distinguibles una de la otra. La primera región identificada, marcada con azul, es una corta alfa hélice (residuos 81-89). Si se observa la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la geometría de esta hélice, se puede observar que estos dos tipos de residuos se distribuyen de manera polar (figura 9C). Otra manera de expresar esto es calculando el momento hidrofóbico (μH), que es una medida de la anfipaticidad de una hélice. Esta hélice presenta un μH de 0.339. La segunda región identificada, marcada con verde es una larga alfa hélice continua (residuos 99-140). La tercera región identificada, marcada en amarillo, es una región compuesta de alfa-hélices cortas interrumpidas por regiones conectoras no estructuradas (residuos 141-200). Las últimas dos regiones identificadas en la región carboxilo de MotF, marcadas en naranja y rojo, son una alfa-hélice corta (residuos 201-213) seguida de una larga región no estructurada rica en lisinas, argininas, alaninas y prolinas (residuos 214-239).

Características presentes en MotF relacionadas a proteínas asociadas a motores

La delección de MotF resulta en un fenotipo Mot⁻. Más aún, pseudorevertantes que suprimen este fenotipo poseen versiones mutantes de MotB, que reducen la hidrofobicidad de la hélice anfipática correspondiente a la región del tapón, por lo cual se ha considerado que estas versiones de MotB probablemente resultan en canales de protones continuamente abiertos. En otros sistemas, como el sistema Tol-Pal, se pueden encontrar dos proteínas transmembranales que forman el canal de protones, una proteína transmembranal asociada al canal y una o varias proteínas periplásmicas (Ver Anexo I). Dentro del motor flagelar, MotA y MotB son análogas a las proteínas que forman el canal de protones en los sistemas Tol-Pal y Exb-Ton. Adicionalmente, el dominio M de FlgT presenta el mismo plegamiento que el dominio N de una de las proteínas periplásmicas del sistema Tol-Pal, TolB. Sin embargo, nunca se ha descrito una proteína transmembranal asociada al canal de protones MotAB. Por lo tanto, se decidió hacer una búsqueda de características presentes en las dos proteínas asociadas a canales de protones más estudiadas, TolA y TonB.

En primer lugar se decidió analizar la presencia de hélices superenrolladas en la región periplásmica de MotF (coiled-coils), como la que se predice en la región periplásmica de TolA. En la figura 9B se muestra la comparación de dos gráficas generadas por el servidor MARCOIL, predictor de hélices superenrolladas. La primera es para la región periplásmica de MotF (a partir del residuo 72) mientras que la segunda es para la región periplásmica de TolA de *E. coli*. La probabilidad de formar el patrón característico de una hélice superenrollada se muestra en forma de gráfica contra la posición en la secuencia. Como se puede ver en la gráfica para MotF, la región inmediata al cruce transmembranal, presumiblemente la alfa hélice corta, presenta una probabilidad de menos de 0.4. Sin embargo, en la región aledaña, predicha como una alfa hélice continua (entre los aminoácidos 90-140), la probabilidad de formar una hélice superenrollada aumenta por encima de 0.8. Esto es similar a TolA, en donde la región inmediata al

cruce transmembranal presenta una alta probabilidad de formar hélices superenrolladas, a pesar de que esto se mantenga en una región mucho más larga (entre los aminoácidos 40 y 260).

El dominio III de TolA presenta un plegamiento característico conservado entre distintas especies, y se encuentra también en TonB [38]. Por esto, se decidió ver si este plegamiento característico se encontraba en MotF. Si se superimpone la estructura de la región carboxilo terminal de TolA de *P. aeruginosa* generada con cristalografía de Rayos X [38] con el modelo generado para MotF, se observa que aunque similares por la presencia de hélices superenrolladas, presentan plegamientos distintos (Figura 9D).

Finalmente, decidimos tornar nuestra atención a la región carboxilo terminal no estructurada de MotF. Notamos que había una gran proporción principalmente de lisinas, alaninas y prolinas. De hecho, a partir de la aparición de la primera prolina en la región “no estructurada”, los residuos de lisina, arginina, alanina y prolina corresponden a al 53% de la secuencia. Estos residuos son los más propensos a formar una estructura de hélices de poliprolinas tipo II [39]. El motivo de hélice de poliprolina tipo II es un elemento recientemente descrito para otra proteína asociada a canales de flujo de protones, TonB [40].

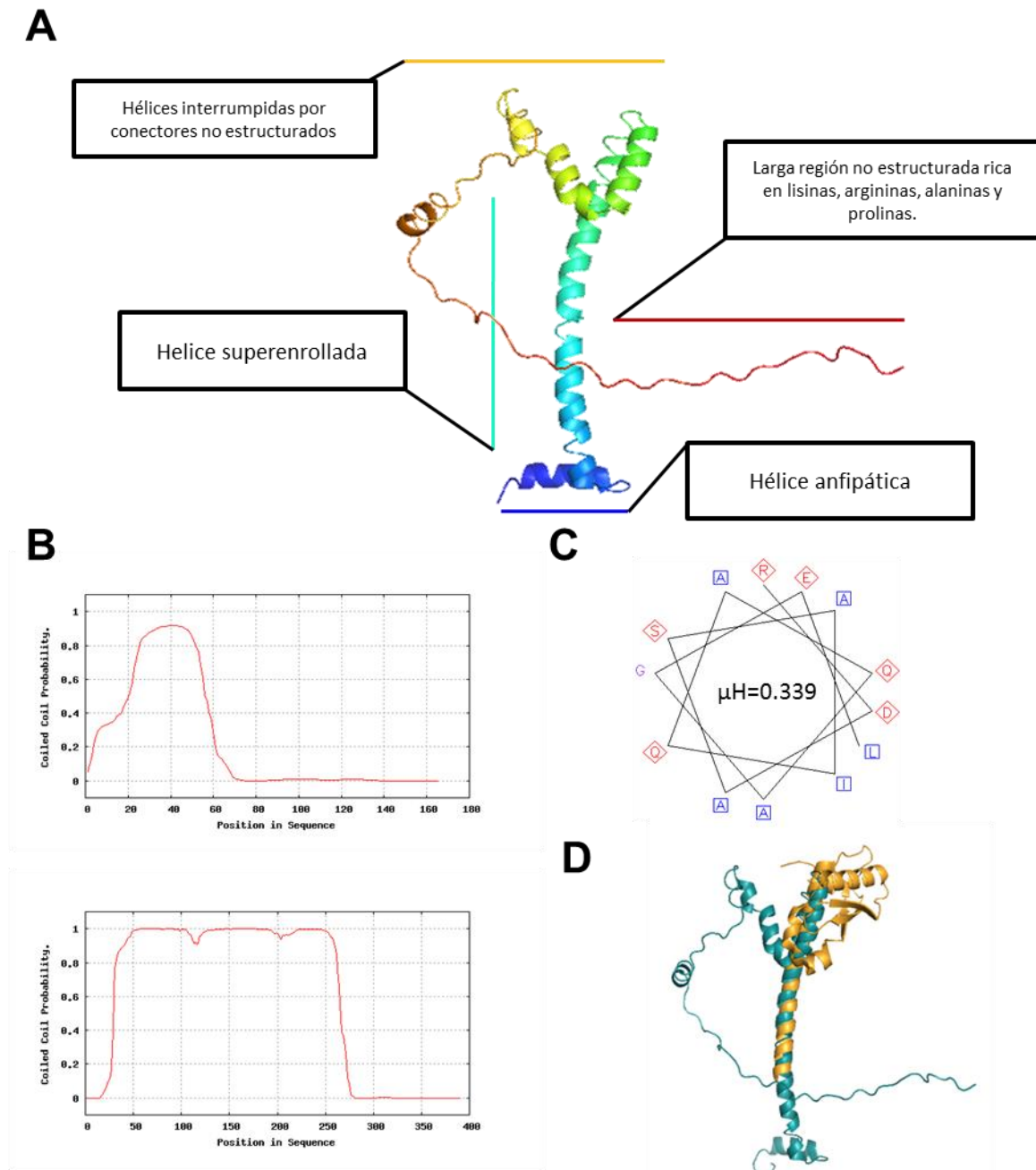


Figura 9. Características identificadas en la región periplásmica de MotF.

A) Modelo generado por el servidor HHpred de una posible conformación tridimensional de la región periplásmica de MotF. Las posición de las regiones identificadas se marcan con una línea, las características de cada región se exponen en los recuadros. B) Predicción de la presencia de hélices superenrolladas en la región periplásmica de MotF (arriba) y TolA (abajo). C) Proyección helicoidal de la hélice en la parte amino terminal de la región periplásmica de MotF. El momento hidrofóbico se muestra en un recuadro en el centro de la hélice ($\mu H=0.339$) Los residuos polares se muestran en rojo y los hidrofóbicos en azul. D) Superposición de la estructura terciaria de TolA (en naranja) con el modelo generado por el servidor HHpred de MotF (turquesa).

Participación de la región carboxilo terminal de MotF en la rotación del flagelo de *R. sphaeroides*

Debido a la importancia que se propone tienen las hélices de poliprolinas en la extensión de TonB a través del periplasma y su capacidad de asociación con diversas proteínas de membrana externa [40], decidimos eliminar la región carboxilo terminal de MotF, que podría formar una hélice de poliprolinas, y evaluar las características funcionales de MotF previamente reportadas [24]. Dichas características son: su capacidad para complementar la función en una cepa $\Delta motF$ y su asociación a la estructura flagelar que se sabe esta mediada por FlgT [23]. Se generaron dos formas truncas de MotF. En la primera, se eliminó la región “no estructurada” rica en lisinas, argininas, alaninas y prolinas (residuos 214 a 239), mientras que en otra se eliminó, además de la región rica en lisinas, argininas, alaninas y prolinas, la corta alfa hélice inmediatamente amino-terminal (figura 10). Estas versiones truncas de MotF se denominan ΔK y ΔG , respectivamente.

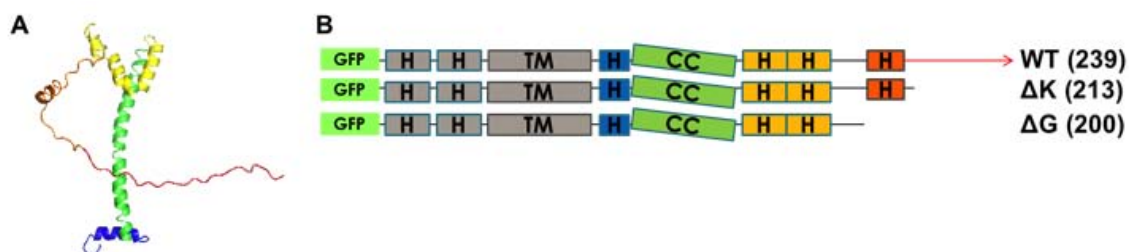


Figura 10. Formas truncas de MotF.

A) Modelo tridimensional de la región periplásmica de MotF. Cada una de las regiones discernibles se muestra de un color distinto. Se muestra la hélice anfipática en azul, la región de hélice superenrollada en verde, las hélices interrumpidas en amarillo, la corta hélice y región no estructurada en naranja y la región rica en prolinas, alaninas y lisinas en rojo. B) Esquemas de las formas truncas de MotF utilizadas en este trabajo. Se muestra la forma silvestre fusionada a GFP (WT), la forma sin la región rica en prolinas, alaninas y lisinas (ΔK) y la forma sin la última hélice predicha ni la región rica en prolinas, alaninas y lisinas (ΔG). La longitud de la secuencia de cada forma en aminoácidos se muestra en paréntesis.

Ambas formas se fusionaron a la proteína verde fluorescente (GFP) y se clonaron en el vector de expresión pRK415. Como se puede ver en la figura 11A, a diferencia de la clona que expresa GFP-MotF, ninguna de las proteínas con la deleción en la región C-terminal fue capaz de restaurar la capacidad de nado de la cepa mutante $\Delta motF$. Posteriormente, se evaluó la localización de las proteínas GFP-MotF ΔK y GFP-MotF ΔG por microscopía de epifluorescencia. Como se observa en la figura 11, GFP-MotF se localiza como un solo foco fluorescente, mientras que la GFP-MotF ΔK muestra un patrón de fluorescencia en el contorno del cuerpo celular. Por otro lado, GFP-MotF ΔG muestra un patrón similar, pero más difuso. Es decir, el contorno celular no se aprecia con la claridad con la que se aprecia en las cepas expresando la forma GFP-MotF ΔK . Se muestra también la distribución de GFP-MotF en una cepa en la cual se encuentra ausente FlgT, en la cual no se ve ningún patrón distinguible.

Para determinar la integridad de las versiones GFP-MotF ΔG y GFP-MotF ΔH , se realizó un ensayo de inmunodetección con extractos totales de las cepas mencionadas. Como se puede observar en la figura 11C, la cepa que expresa GFP-MotF presenta una banda de aproximadamente 55 kDa, lo cual es el peso molecular esperado para esta proteína. Para MotF ΔK se observa una banda de 52 kDa. Sin embargo, para ΔG no se observa una banda. Por lo tanto, podemos concluir que en ausencia de los últimos 39 residuos de la región C terminal de MotF la proteína es inestable y se degrada fácilmente, mientras que en ausencia de los últimos 26 residuos la proteína es estable pero dicha versión no es funcional y no es capaz de localizarse a la base del flagelo.

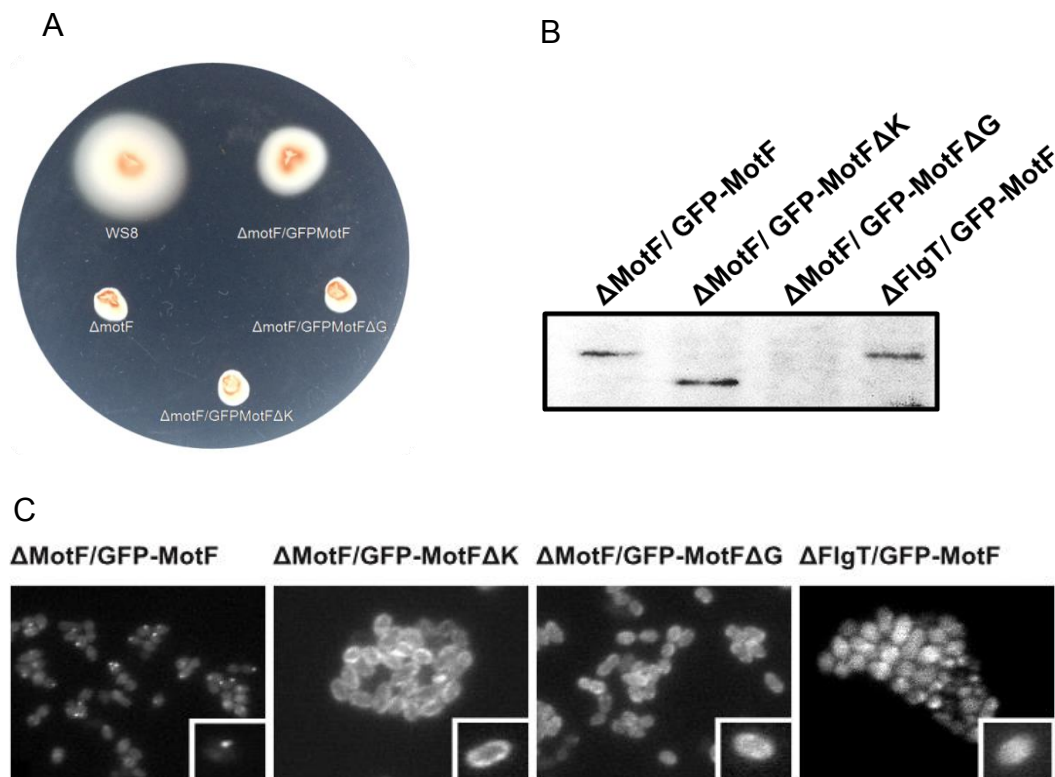


Figura 11. La región carboxilo terminal de MotF es esencial para su función y localización.

A) Ensayos de nado de las cepas expresando distintas formas de la proteína MotF. En una caja de nado se sembró la cepa silvestre (WS8), la cepa mutante en MotF ($\Delta\text{motF}::\text{aadA}$), la cepa mutante en MotF complementada con la proteína de fusión GFP-MotF (GFP-MotF), y la cepa complementada con los plásmidos que expresan las formas truncas de MotF fusionadas a la proteína GFP, i.e. ΔK (GFP-MotF ΔK) o ΔG (GFP-MotF ΔG). El nado se mide como la formación de un halo después de 48h. B) Microscopía de epifluorescencia de cepas expresando la proteína de fusión de GFP con la forma completa o las formas truncas de MotF. En la parte de arriba se indica el fondo genético y la construcción expresada. En el recuadro interno se muestra un acercamiento a una sola célula. C) Inmunodetección de MotF con anticuerpos policlonales generados en el laboratorio. Se muestra la región de la membrana correspondiente de 50 a 56 kDa, el peso esperado para la proteína de fusión completa, es de 54 kDa; el peso esperado para las formas truncas es de 51 kDa.

DISCUSIÓN

La mayor parte de nuestro entendimiento del funcionamiento del flagelo bacteriano proviene de estudios genéticos hechos en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. El interés por entender la diversidad del flagelo es relativamente reciente. En el caso particular del estator del flagelo, esto resulta en una división entre componentes canónicos (aquellos reportados en *E. coli* y presentes o muy conservados en otras especies) y no canónicos (componentes únicamente reportados en ciertos géneros o especies, o muy poco conservados). En este sentido *Rhodobacter sphaeroides* plantea una oportunidad interesante, ya que es un organismo modelo, cultivable en condiciones de laboratorio y con al menos tres componentes no canónicos del estator: FliL, FlgT y MotF. El presente trabajo se enfoca en estas últimas dos proteínas.

FlgT es una proteína periplásmica descrita originalmente en el flagelo de la bacteria marítima *Vibrio alginolyticus*. En esta bacteria, se ha propuesto que FlgT ejerce dos funciones: una de conferir estabilidad estructural al flagelo [41] y otra en promover su rotación [27]. En relación a esta última función, la visión actual es que FlgT participa en la rotación del flagelo de *V. alginolyticus* reclutando otros dos componentes no canónicos del estator, MotX y MotY [27]. MotX y MotY a su vez, se encargan de reclutar a los complejos estatores, promoviendo de esta manera la rotación del flagelo.

La proteína FlgT se encuentra presente también en *R. sphaeroides*, y al igual que en *V. alginolyticus*, es necesaria para la formación del anillo H. La alta similitud estructural entre estas proteínas contrasta con su baja similitud a nivel de secuencia primaria (17%) [23]. Lo anterior sugiere que la función de esta proteína podría haber sufrido adaptaciones para cumplir su función en un motor impulsado por protones, como lo es el de *R. sphaeroides*. En este sentido destaca que ni MotX ni MotY tienen homólogos descritos en *R. sphaeroides*. Por lo tanto, se ha propuesto que la función que realiza FlgT en *R. sphaeroides* podría ser distinta a la reportada para *V. alginolyticus*.

Al iniciar este trabajo se tenía la idea de que la proteína FlgT en *R. sphaeroides* podría participar en reclutar o estabilizar los complejos estatores, directa o indirectamente, en el flagelo. Además, se sabía que la presencia de MotF en el flagelo era dependiente de FlgT [23]. Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos el determinar los dominios o regiones de interacción entre estas proteínas.

Gracias al trabajo de Imada del 2013, se sabe que existen tres dominios distinguibles en la estructura tridimensional de FlgT, denominados N (amino-terminal), M (medio) y C (carboxilo-terminal) [28]. Tomando como base los límites definidos por Imada *et al.* En este trabajo se analizaron los tres dominios de FlgT de *R. sphaeroides*,

En un trabajo anterior de nuestro grupo se reportó que en un ensayo de doble híbrido, la región periplásmica completa de MotF no muestra interacción con FlgT [23]. Sin embargo en algunos casos, al exponer algunas regiones de una proteína en lugar de la proteína completa es posible aumentar o disminuir la afinidad de algunas interacciones. Por lo tanto, se generaron cepas expresando la región periplásmica de MotF completa fusionada al dominio de activación (AD) del factor de transcripción Gal4 y las formas truncas de FlgT fusionadas al dominio de unión al DNA (BD) de Gal4. Como se puede ver en la figura 5, se observó una interacción positiva solamente en los casos en los cuales la levadura expresó MotF y el dominio carboxilo terminal de FlgT. En este caso se corrigieron las auxotrofías tanto de histidina como de adenina, lo que indica que la región carboxilo terminal de FlgT fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4 (FlgT_C-Gal4BD) interacciona fuertemente con la proteína Gal4AD-MotF.

Un resultado similar fue observado al probar la interacción de los diferentes dominios de FlgT con las regiones periplásmicas de MotB y FliL fusionadas al dominio AD de Gal4 (figura 6).

Los experimentos anteriores sugerían que la función de FlgT en *R. sphaeroides* era mediada en gran parte por su dominio C-terminal, ya que en éste

podían encontrarse los determinantes de interacción con MotB, MotF y FliL. Por lo tanto, se hipotetizó que una mutante que expresara una versión de FlgT sin el dominio C-terminal, debía ser no mótil. Esto contrastaría con la función reportada en *V. alginolyticus*, donde la ausencia del carboxilo resulta en células móviles aunque con una capacidad de nado ligeramente disminuida [28]. Para probar esta hipótesis, decidimos realizar un ensayo de complementación de la cepa SF3 ($\Delta flgT$) con una forma trunca de FlgT, sin el dominio carboxilo terminal. Sin embargo, al observar al microscopio las células complementadas con la forma trunca de FlgT, se observó que las células se encontraban nadando. No obstante, al probar estas células en cajas de agar suave, se observó una reducción en el tamaño del halo de desplazamiento con respecto al que forma la cepa silvestre. Dado que una de las hipótesis acerca de la función de los componentes adicionales del motor de *R. sphaeroides* es que estos sirven para conferir robustez o fuerza adicional a la rotación flagelar. Nos preguntamos si la disminución que se observaba en el nado era por una pérdida en esta robustez, y si esta diferencia se haría más evidente al probar la capacidad de nado de las cepas en medios densos. Por lo tanto, decidimos medir la capacidad de nado de manera simultánea en tres condiciones de densidad del medio de desplazamiento. Sin embargo, como se muestra en la figura 5, a pesar de que existe una diferencia entre el nado de la cepa complementada con la forma trunca FlgT Δ C, esta diferencia, correspondiente aproximadamente al 40%, se mantiene igual de manera independiente de la densidad del medio. Por lo tanto, podemos ver que FlgT Δ C en *R. sphaeroides* produce un fenotipo similar al observado en *V. alginolyticus*, esto es, células móviles con una capacidad de movimiento disminuida [28]. Los resultados anteriores nos llevaron a cuestionar los resultados del ensayo de doble híbrido.

Se procedió a evaluar la posible interacción inespecífica entre la región carboxilo terminal de FlgT con el dominio de activación de Gal4. Para ello, se obtuvieron cepas que expresaron el dominio de activación (AD) de Gal4 sin una proteína fusionada y el dominio de unión al DNA de Gal4 (BD) fusionado a los dominios MC y C de FlgT. En la figura 8 se puede observar el crecimiento de ambas cepas en ausencia de His y/o Ade. Por lo tanto, concluimos que el dominio

carboxilo terminal de FlgT es capaz de interactuar directamente con el dominio AD de Gal4. Esto descarta la posibilidad de explorar las interacciones de fragmentos que contienen el dominio C-terminal de FlgT con otras proteínas, incluyendo MotF, por medio del ensayo de doble híbrido.

El análisis estructural de MotF reveló cuatro regiones distinguibles en la proteína. Como ya se mencionó, MotF no comparte similitud con ninguna proteína descrita o siquiera anotada previamente. Esto dificulta su estudio, ya que la homología generalmente sirve como un criterio importante para proponer funciones. A pesar de que la secuencia de MotF no pueda ser usada para encontrar proteínas similares, recientemente se ha propuesto que la estructura tridimensional de las proteínas puede utilizarse para proponer homología, particularmente entre proteínas filogenéticamente distantes. Sin embargo, MotF no está cristalizada, lo que significa que aún no se sabe nada acerca de su estructura tridimensional. Como una alternativa a esto, se utilizó el servidor HHpred, parte de las herramientas bioinformáticas del Instituto Max Planck [42]. Este servidor construye, a través de alineamientos locales reiterativos de alta sensibilidad, modelos de Markov que reflejan la probabilidad de que cada residuo se encuentre en una posición dada. Estos modelos de Markov sirven para generar una base de datos contra la cual se pueden comparar proteínas cuya estructura no ha sido caracterizada. Así, en muchos casos, este servidor puede establecer similitudes entre proteínas sin ninguna relación filogenética, pero que guardan información estructural similar en sus secuencias. Al analizar la estructura primaria de MotF, este servidor generó un modelo tridimensional, el cual se presenta en la figura 9. Así mismo se señalan las 4 regiones distinguibles en este modelo. Estas observaciones nos llevaron a sugerir que MotF podría presentar algunas de las características estructurales descritas para TolA y TonB [43, 44].

Las bacterias ocupan la fuerza protón motriz como fuente de energía directa para una variedad de procesos (ver anexo 1). Esto probablemente se debe a que la energía contenida en el gradiente electroquímico de protones en el espacio extracelular es una fuente de energía eficiente (revisado en [44]). Como se

mencionó, los dos sistemas asociados a canales de flujo de protones que más asemejan a los del flagelo bacteriano son el sistema Tol-Pal y el sistema Exb-Ton [45]. Estos se encargan de mantener la integridad estructural de la envoltura celular y del transporte de distintos nutrientes, respectivamente [44]. A pesar de que los sistemas Tol-Pal y Exb-Ton tienen una relación mucho más cercana entre ellos, existe la posibilidad de que el sistema MotAB pudiera tener una relación evolutiva con estos sistemas. Este hecho se ha indagado ampliamente en la literatura [45, 46]. Sin embargo, a diferencia del sistema MotAB, éstos constan de cuatro tipos de componentes. Para explicar las características de estos cuatro componentes, tomemos como ejemplo el sistema Tol-Pal. El sistema Tol-Pal está compuesto por una proteína integral de membrana con múltiples cruces transmembranales, denominada TolQ, una proteína con un único cruce transmembranal y una región periplásmica globular, denominada TolR, una proteína con un único cruce transmembranal y una larga región periplásmica extendida, denominada TolA, una proteína periplásmica, compuesta principalmente por plegamientos de hojas beta, denominada TolB y la lipoproteína de membrana externa Pal [43] (para mayor información acerca de este sistema, ver anexo 1). TolQ y TolR se asocian para formar un canal de protones similar al formado por MotAB [45]. Adicionalmente, el dominio amino-terminal de TolB y el dominio M de FlgT son estructuralmente análogos, pues ambos presentan un plegamiento α/β [28]. Sin embargo, no se ha descrito un homólogo para TolA dentro del motor flagelar.

En nuestro estudio, encontramos evidencia que sugiere que MotF podría compartir algunas características con proteínas como TolA. El primer indicio de que MotF podría ser similar a TolA o a TonB es su topología. MotF presenta una pequeña región citoplásmica, un único cruce transmembranal, y una larga región periplásmica. De primera instancia, se decidió buscar en el modelo generado por HHpred el plegamiento característico de la familia TolA/TonB. La presencia de este motivo habría sido evidencia importante de una relación evolutiva entre MotF y estas proteínas. Sin embargo, como se ve en la figura 9D, el modelo generado por el servidor (amarillo) no presenta ninguna hoja beta, como las que se observan

en el plegamiento de TolA de *P. aeruginosa*. Aun así, se decidió seguir buscando características estructurales comunes entre MotF y TolA/TonB. Así pudimos observar como se muestra en la figura 9C, que en MotF se predice la formación de una hélice superenrollada (residuos 100 a 127), elemento característico a lo largo de TolA.

La similitud en topología y la presencia de la hélice superenrollada nos llevaron a reconsiderar la propuesta de que la región carboxilo terminal de MotF era una región no estructurada. Esto porque en TonB (239 aa), la proteína asociada al canal de protones ExbBD, recientemente se describió la presencia de un motivo estructural conocido como hélice de poliprolinas, localizada en la región periplásmica de TonB entre los residuos 70 a 102 [40].

Las hélices de poliprolinas son un motivo estructural de descubrimiento relativamente reciente. Estas hélices surgen por la presencia de residuos de prolina acomodados de manera continua en una secuencia. Esto introduce una torsión levógira que, si bien en otros casos interrumpe la formación de alfa-hélices, al estar estos residuos acomodados secuencialmente, generan una “hélice” de giro a la izquierda. Por esto, estas hélices son rígidas (revisado en [47]). Recientemente, el grupo de Drescher describió una hélice de poliprolinas en la región periplásmica de TonB. Se piensa que esta conformación rígida y extendida le permite al extremo carboxilo terminal de TonB llegar a establecer un contacto con las proteínas blanco que se encuentran en la membrana externa [40]. Aunque existe evidencia de que la región de poliprolina es dispensable para que TonB cumpla su papel fisiológico bajo condiciones de cultivo estándar, bajo ciertas condiciones en las cuales se presume un aumento del espacio periplásmico (estrés osmótico), fue posible observar la importancia de dicha región [48].

Por otro lado, se sabe que la localización de MotF en la base del flagelo depende de FlgT [23], una proteína localizada a la altura de la pared celular, por lo cual nosotros consideramos que esta posible hélice de poliprolinas podría ser el sitio de contacto entre MotF y FlgT o alguna otra proteína asociada al anillo H del motor flagelar.

Para probar esta hipótesis, se generaron dos formas truncas de MotF carentes de diferentes segmentos de la región carboxilo terminal. En la primera, ΔK , se eliminó la región rica en lisinas, alaninas y prolinas, a partir del residuo 213 hasta el carboxilo terminal de la proteína. En la segunda, ΔG , se amplió la región eliminada, hasta el residuo 200. Estas formas se fusionaron a la proteína verde fluorescente para poder seguir su localización *in vivo*. Como se ve en la figura 9, al hacer un ensayo de complementación con las formas de GFP-MotF ΔK o GFP-MotF ΔG sin la región carboxilo terminal, las células no son capaces de desplazarse. Esto se explica al ver la microscopía de fluorescencia, donde se observa que MotF no se localiza a la base del flagelo en ausencia de su región carboxilo terminal. A pesar de que las formas ΔK y ΔG tienen un patrón de fluorescencia similar, en el caso de ΔG se observa una señal mucho más difusa. Esto nos llevó a pensar que esta forma podría estarse degradando. Al hacer la inmunodetección, esto quedó confirmado, ya que se puede observar claramente la banda correspondiente a la forma ΔK , mas no así la de la forma ΔG . Por lo tanto, sabemos que la forma de MotF sin los últimos 26 residuos de la región carboxilo terminal es estable, pero incapaz de asociarse con el flagelo o cumplir su función en promover la rotación.

En los complejos TolQRA y ExbBD-TonB, se sabe que existe una interacción entre la proteína asociada al canal, por ejemplo TolA y la proteína de múltiples cruces transmembranales, i.e. TolQ. Más aún, se sabe que esta interacción es esencial para el funcionamiento del sistema, y que esta interacción sucede entre la hélice transmembranal de TolA y la primera hélice transmembranal de TolQ [43, 49]. Si MotF tiene una relación con las proteínas que forman el canal de protones flagelar, es posible que sea capaz de interactuar a través de su región transmembranal con MotA. La idea de que MotF interacciona con MotA a través de su hélice transmembranal fue propuesta originalmente en el trabajo de Ramírez-Cabrera y colaboradores. Esto porque tanto MotF como MotA presentan un motivo de interacción entre hélices transmembranales, conocido como GXXXG [24]. Este motivo se caracteriza por la presencia de dos glicinas presentes en una alfa hélice, separadas por una vuelta completa (tres aminoácidos), lo cual las deja expuestas

en la misma cara de la hélice (revisado en [50]). Estas glicinas, inmersas en el ambiente hidrofóbico de la membrana, pueden entonces formar puentes de hidrógeno con glicinas presentes en otras alfa-hélices. La presencia de tal motivo en la primera hélice transmembranal de MotA y en la única hélice transmembranal de MotF sugiere que estas dos proteínas podrían interactuar por este mecanismo [24].

Sin embargo, queda la interrogante de por qué MotF parece encontrarse únicamente en *R. sphaeroides* ya que, si tuviera un origen común con otras proteínas asociadas a canales de protones, como TolA o TonB, sería antigua y por lo tanto de esperarse que fuera ubicua, o por lo menos más común. ¿Podría ser entonces que exista una presión de selección presente únicamente en *R. sphaeroides*? En este punto es interesante mencionar una serie de evidencias acerca del reclutamiento de complejos MotAB a la base del flagelo.

Para generar torque e impulsar al flagelo, MotA interacciona con FliG, una proteína del rotor, a través de un asa citoplásmica cargada [3]. Sin embargo, la generación de torque no es la única función de estas interacciones electrostáticas. Se sabe que existe una distinción entre pares de residuos (uno en MotA y uno en FliG, con cargas opuestas) que sirven para generar torque y pares de residuos que sirven para reclutar o promover la incorporación de complejos MotAB a la base del flagelo [15, 51]. Esta propiedad recientemente se describió también para PomA en *V. alginolyticus* [52]. La interacción electrostática involucrada en el reclutamiento del estator de *V. alginolyticus* se establece entre el residuo de lisina 284 de FliG y el residuo de ácido aspártico 97 de PomA. Al hacer el alineamiento entre PomA de *V. alginolyticus* y MotA de *R. sphaeroides*, se puede observar que el residuo de ácido aspártico relevante para el reclutamiento se ha sustituido por un residuo de glicina. Aún más, se puede observar que esa región en MotA de *R. sphaeroides* tendría una carga positiva, por la presencia de un residuo de lisina. Sin embargo, al observar el alineamiento entre FliG de *V. alginolyticus* y FliG de *R. sphaeroides*, se observa una conservación de la lisina 284. Al mismo tiempo, los residuos involucrados en la generación de torque si están conservados (figura 12).

Esto sugiere dos posibilidades: o existieron modificaciones subsecuentes que generaron otras interacciones electrostáticas entre FliG y MotA en *R. sphaeroides*, o esta interacción no es necesaria, y podrían existir mecanismos adicionales para promover la incorporación de complejos MotAB al flagelo de *R. sphaeroides*.

```

pomA_valg      tkiagkafmfkadepedliakivemadaarkggflaleemeinntfmqkgidllvdghda
motA_rsph      fkammkvfkpsrfdmnevistmvelsnlarkdgimalegkavpdaffekglqllvdgtde
                *  *.*  .   :  :::*::**:::  ***  *::***  :  :::*::**:::*****  *

fliG_valg      dqdedmatqiqdlmfvfenlvevddggiqkllrdvpqdvlgkalkgaddslrekvfkms
fliG_rsph      kddkdlmqaiqdnmfvfdnlksddrslqtllravdnetlvlalkgadeglakilgcms
                .::*:  ***  *****:::  **::*.*.***  *  ::.*  *****:.*.  *::  **

```

Figura 12. Sustitución en el par de residuos involucrados en la interacción MotA-FliG en *Rhodobacter sphaeroides*

En la parte de arriba se muestra una región de interés en el alineamiento entre las secuencias de PomA de *Vibrio alginolyticus* (pomA_valg) y MotA de *Rhodobacter sphaeroides* (motA_rsph). En azul se muestran los residuos de arginina y lisina 88 y 89 de *V. alginolyticus* y su conservación en *R. sphaeroides*. En rojo se muestran los residuos de ácido aspártico 97 y 99 y el residuo de metionina 98 de *V. alginolyticus*, y su sustitución en *R. sphaeroides*. En la parte de abajo se muestra una región de interés del alineamiento entre las secuencias de FliG de *V. alginolyticus* (fliG_valg) y FliG de *R. sphaeroides*. En verde se muestra el residuo de lisina 284 de *V. alginolyticus* y su conservación en *R. sphaeroides*. Alineamientos realizados en Clustal Omega.

Por lo expuesto anteriormente, se propone que MotF puede servir como un mecanismo adicional de incorporación de complejos MotAB al flagelo de *R. sphaeroides*. Un contraargumento a este modelo que se debe de considerar proviene de la evidencia de la aparición de mutantes pseudorevertantes, esto es, al deletar ya sea FlgT o MotF, las cepas que logran suprimir esta mutación siempre tienen sustituciones de residuos hidrofóbicos por residuos polares en la región de tapón de MotB [23, 24]. Es decir, las mutaciones provocarían que los canales MotA/MotB se encontraran permanentemente abiertos [9]. Alternativamente, si

MotF contrarrestara la incapacidad de MotA de asociarse al rotor, sería de esperarse encontrar mutaciones puntuales en MotA que corrigieran esta deficiencia, lo cual en caso de ocurrir no es un evento frecuente [23, 24]. Sin embargo, si consideramos que la función central de MotF fuera la de reclutar canales a la base del flagelo, y suponemos que una subunidad generadora de torque con un canal permanentemente abierto tiende a incorporarse de manera efectiva con mayor facilidad a la base del flagelo, entonces la aparición de las mutaciones pseudorevertantes podrían ser explicadas.

En resumen, en este trabajo se analizó de manera bio-informática la región periplásmica de MotF, a partir de estos análisis se observó que MotF, muestra ciertos elementos estructurales similares a los reportados para TolA y TonB. La existencia de una posible relación de ancestría o convergencia evolutiva entre estas proteínas queda como una posibilidad interesante para ser explorada. Además, a partir de las similitudes entre MotF y TolA/TonB, podemos suponer que existe una interacción entre los complejos MotAB y MotF a través de su región transmembranal. Asimismo, los resultados de este trabajo demuestran que la región carboxilo terminal de MotF es necesaria para su localización. Dicha localización parece ser absolutamente dependiente de la interacción entre el extremo C-terminal de MotF y FlgT. De este modo, MotF actuaría como un puente entre el cuerpo basal flagelar y los complejos MotAB. Sin duda, hacen falta más estudios que permitan comprobar esta hipótesis, y de esta manera seguir indagando en la función de esta fascinante proteína, única en su clase.

Anexo I: Los Sistemas Tol-Pal y Exb-Ton

La fuerza protón-motriz

La fuerza protón motriz se puede describir como la energía potencial contenida en el gradiente electroquímico formado por la membrana interna de procariontes y de mitocondrias en eucariontes. La energía libre de Gibbs generada por las reacciones de oxidación que suceden en la cadena de transporte de electrones se utiliza para bombear protones fuera del espacio citoplasmico [53]. Esto genera un fuerte gradiente electroquímico. Esto provee una fuente de energía relativamente estable que puede ser utilizada de diversas maneras. Otra manera de decir esto es que, el flujo de protones a través de la membrana puede ser acoplado con procesos que requieren energía [53].

La fuerza protón motriz como una fuente de energía

Tal vez el mejor ejemplo de este acople es la síntesis de ATP. La ATP sintasa es un complejo enzimático embebido en la membrana. Una parte fundamental de este complejo son proteínas transmembranales que forman “canales” de protones. Estos generan un paso a través de la membrana celular hidrofóbica, normalmente impermeable a estos protones. Al pasar tres protones por la membrana, estos promueven un movimiento rotatorio en el complejo de la ATP sintasa. Esta energía a su vez se aprovecha para catalizar la reacción de $\text{ADP} + \text{P}_i$, generando así ATP. El ATP generado sirve como base para proveer de energía a toda una serie de funciones celulares [revisado en [54]].

La generación de ATP no es el único ejemplo del uso de la fuerza protón motriz. Existe otro complejo rotatorio multiproteico propulsado por esta misma fuerza: el flagelo bacteriano [55]. En este caso, dos proteínas, conocidas como MotA y MotB forman en conjunto los canales que permiten el flujo de protones [8]. El movimiento protones induce cambios conformacionales se transmiten a la base rotatoria del flagelo, que se traduce en torca sobre el filamento [3]. Este fenómeno se explora con más detalle en la sección introductoria de esta Tesis.

Existen otros ejemplos de acoplamiento de la fuerza protón motriz, el propósito de este apéndice está en explorar a detalle dos ejemplos concretos: El sistema Tol-Pal y el sistema Exb-Ton.

El sistema Tol-Pal: Componentes

El sistema Tol-Pal es un determinante esencial de la estabilidad de la envoltura celular en bacterias. *Escherichia coli* es el modelo en el cual se ha descrito más extensivamente este sistema, de donde proviene la información presentada en este anexo. En *E. coli*, el sistema Tol-Pal se compone de siete proteínas [43]. Estas se agrupan en dos operones, cada uno con su propio promotor. Para fines de esta descripción, el sistema Tol-Pal se dividirá en 3 componentes membranales y 2 componentes periplásmicos. Los componentes de este sistema se esquematizan en la figura 3. Los componentes membranales son TolQ, TolR y TolA, mientras que los componentes periplásmicos son TolB y la lipoproteína asociada a peptidoglicano Pal. A continuación se presenta una breve descripción de cada componente.

TolQ.- TolQ es una proteína integral de membrana compuesta primordialmente de alfa hélices. Consta de tres hélices transmembranales, con una prominente asa citoplásmica entre las hélices 1 y 2 y una asa periplásmica corta entre las hélices 2 y 3. Se sabe que interacciona con TolA a través de su hélice número uno y con TolR a través de su hélice número tres [43].

TolR.- TolR es una proteína integral de membrana que consta de una pequeña región amino terminal citoplásmica de 20 aa, una única hélice transmembranal y una región de 102 aa en su región periplásmica (en *E. coli*). En la hélice transmembranal presenta un residuo de ácido aspártico conservado esencial para el flujo de protones [45]. En su región periplásmica consta de una región alargada conocida como región II seguida de una región globular, o región III. Estas regiones periplásmicas son capaces de dimerizar [56]. Junto con TolQ forma el canal de flujo de protones, en una estequiometría de al menos cuatro moléculas de TolQ por dos moléculas de TolR [57].

TolA.- TolA es una proteína integral de membrana que consta de una región amino-terminal de tan solo 11 aa, una región transmembranal de 36 aa y una región periplásmica de 389 aa. Estructuralmente, TolA se puede separar en tres dominios: I, II y III. El dominio I se considera la región transmembranal (residuos 1 a 47), mientras que la región periplásmica se divide en los dominios II y III. El dominio II, (residuos 48 a 310) se caracteriza por la presencia de motivos de hélice superenrollada. Por otra parte, el dominio III (residuos 311 a 421), presenta una región estructurada en forma de hélice seguida por un plegamiento característico [58]. Este dominio, en el extremo carboxilo terminal, define a la familia de proteínas TolA/TonB, ya que incluso entre proteínas de esta familia con bajo grado de identidad de secuencia, se puede ver una homología estructural [38]. Estos tres dominios se encuentran separados por un conector rico en glicinas, lo que les confiere cierto grado de libertad de movimiento [59].

TolB.- TolB es una proteína periplásmica que consta de dos dominios denominados amino (N) y carboxilo (O) conectados por una región flexible no estructurada. El dominio amino, de 119 aa, presenta un plegamiento característico conocido como plegamiento α/β , que consiste de 2 alfa-helices intercaladas entre cinco hojas betas [60]. Por su parte, el dominio carboxilo, de 264 aa, presenta un plegamiento conocido como “propela beta”, que consiste en seis hojas beta que adoptan una conformación toroidal alrededor de un eje central [60]. Se sabe que TolB no solo es capaz de dimerizar, sino que también interacciona fuertemente con el dominio III de TolA [61].

Pal.- Pal recibe su nombre de las siglas en inglés *Peptidoglycan Associated Lipoprotein*. Como su nombre lo indica, esta es una lipoproteína asociada a la pared de peptidoglicano. Al igual que otras proteínas de membrana de externa, Pal se exporta a través del sistema Lol [62]. Esto significa que esta proteína se sintetiza como un precursor, de 173 aa, que posteriormente sufre un corte proteolítico. Así, el primer residuo de la proteína madura es una cisteína. A esta cisteína se le une un ácido graso de manera covalente [63]. Esto, en combinación con la naturaleza hidrofóbica de los residuos siguientes, permite la región amino

terminal actuar como la región de interacción entre Pal y la membrana externa. Por otra parte, la región carboxilo terminal de Pal presenta un plegamiento que resulta en la formación de un cavidad donde se acopla el residuo m-Dap de la pared de peptidoglicano [64]. Así, Pal actúa como una interface entre la membrana externa y la pared de peptidoglicano.

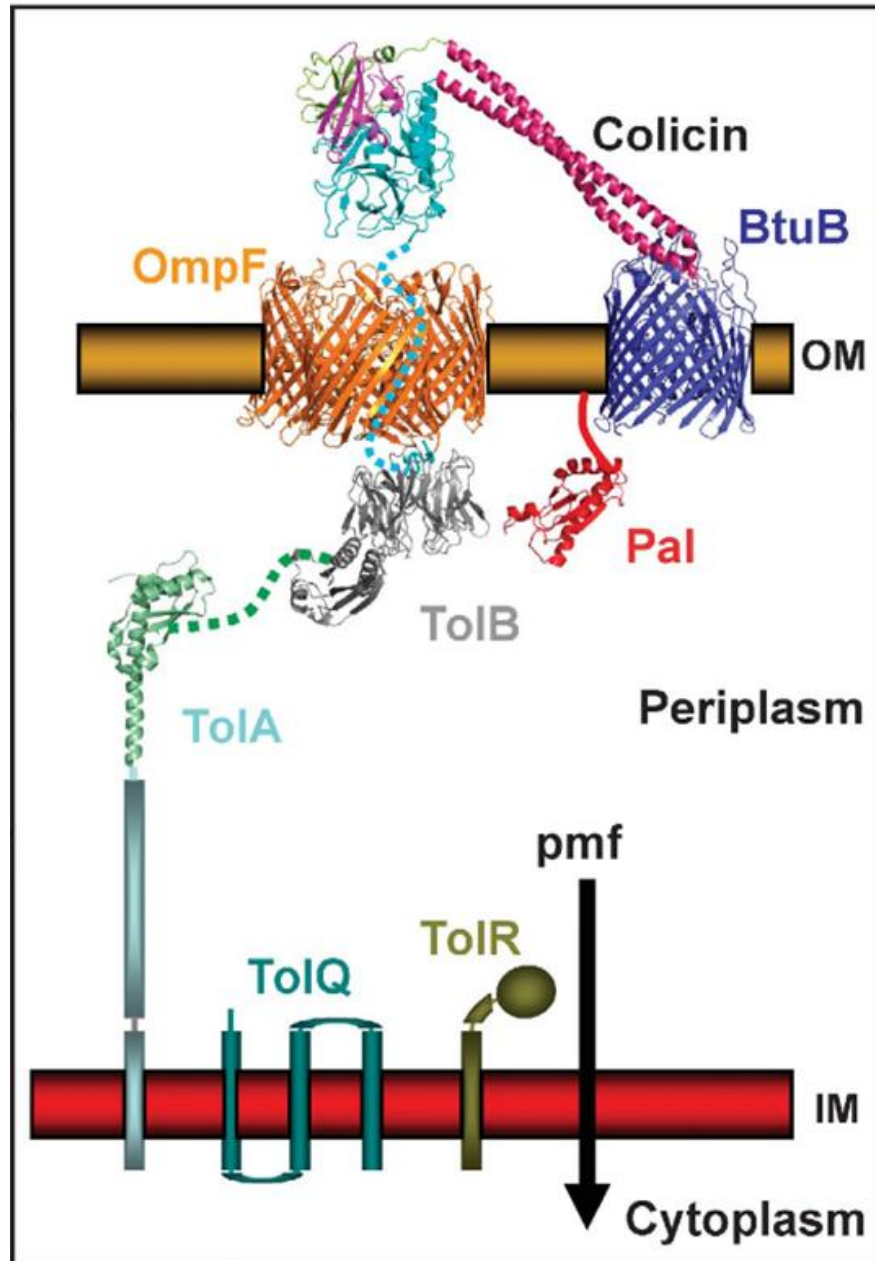
El sistema Tol-Pal: Función

Las proteínas del sistema Tol reciben su nombre del concepto de tolerancia a colicinas. Las colicinas son péptidos bactericidas. Estas proteínas, que normalmente se encuentran en el medio extracelular, parasitan el sistema Tol-Pal para atravesar la envoltura celular. Para hacer esto, aprovechan la capacidad de TolQ y TolR de energizar a TolA. Al interactuar con TolA, TolA transduce la energía generada por el flujo de protones en el canal formado por TolQR para importar a las colicinas. Ya en el interior, las colicinas generan su acción antibacteriana.

Las colicinas son proteínas que han evolucionado para aprovechar la existencia del sistema Tol-Pal. Sin embargo, importar estos péptidos no es la función original de este sistema. Se sabe, que aparte de conferir resistencia a colicinas, mutaciones en este sistema resultan en inestabilidad de la membrana celular. Esto se observa en hipersensibilidad a detergentes, formación de vesículas membranales y fuga de péptidos periplásmicos al medio extracelular. El mecanismo por el cual este sistema realiza esta función permanece por ser esclarecido. El funcionamiento del sistema Tol-Pal se esquematiza en la figura 13.

Figura 13.- El sistema Tol-Pal

En esta figura se muestran modelos obtenidos a partir de difracción de rayos X de los distintos componentes del sistema Tol-Pal. Con fines ilustrativos, éste se muestra siendo utilizado por una colicina para introducirse en el citoplasma. La colicina se asocia con su receptor BtuB y con una porina, como OmpF, para iniciar su proceso de importación. Utilizando su dominio no-estructurado (línea azul punteada), esta colicina recluta a TolB. TolB a su vez recluta a TolA mediante una interacción con su dominio carboxilo terminal. TolA proveerá entonces la fuerza para iniciar la importación de la colicina [tomado de de [65]].



El sistema Exb-Ton: Componentes

ExbB.- ExbB es una proteína integral de membrana formada por tres hélices transmembranales. Sus regiones solubles constan principalmente de asas no estructuradas, siendo el asa entre las hélices 1 y 2 citoplásmica y el asa entre las hélices 2 y 3 periplásmica.

ExbD.- ExbD es una proteína de integral de 141 aa. Posee una corta región amino terminal y una hélice transmembranal (residuos 1-42), una región no estructurada (residuos 43-63), y una región carboxilo terminal compuesta por dos alfa hélices seguidas de cinco hojas beta (residuos 64-141) [66]. En la hélice transmembranal presenta un residuo de ácido aspártico (D25) que es esencial para el uso de la fuerza protón motriz en el sistema Exb-TonB [67]. Se sabe que la región periplásmica de ExbD interacciona directamente con la región periplásmica de TonB, y que esta interacción es importante para la energización de TonB [68].

TonB.- TonB es una proteína integral de membrana de 239 aa. De manera similar a TolA, TonB se puede separar en tres dominios: I, II y III. El dominio I consta de la región amino-terminal y transmembranal (residuos 1-66). El dominio II presenta una región rica en prolinas y lisinas (residuos 66-102) seguida de una región extendida (residuos 103 a 149) [69]. Se cree que el dominio II le confiere a TonB las características necesarias para atravesar todo el periplasma. En el 2010, se demostró que esta región rica en lisinas y prolinas se encuentra en una conformación de hélice de poliprolinas tipo II [40]. El tercer dominio (residuos 150-239) contiene el motivo de plegamiento característico de la familia TolA/TonB [38]. Este plegamiento consta de 3 hojas beta antiparalelas frente a dos alfa hélices [70].

El sistema Exb-Ton: Función

Las bacterias Gram negativas poseen dos membranas. Esto genera el reto de transportar nutrientes, particularmente aquellos en muy bajas concentraciones, contra un gradiente muy alto, en varios pasos. Adicionalmente, en el periplasma no hay ATP, así que la energía debe proveer desde la membrana citoplásmica. En ese sentido, el sistema TonB resulta ventajoso. Existen más de 4600 receptores en 347 especies de bacterias que pertenecen a la familia de receptores dependientes de TonB [69]. Todos estos receptores interactúan directamente con el dominio carboxilo terminal de TonB a través de un motivo conocido como TonB-Box

[revisado en [71]]. Así, estas bacterias pueden importar una gran variedad de sustratos, todos con energía provista por el gradiente de protones de la membrana interna.

Existen dos modelos para la transducción de fuerza por TonB. En el modelo de translocación, se cree que gracias a la energía provista por el flujo de protones, TonB abandona la membrana interna, cruza el espacio periplásmico, e interacciona con el receptor, transduciendo la fuerza en esta interacción [72]. En el modelo de “jalado”, se propone que TonB permanece embebido en la membrana, y su región periplásmica atraviesa todo el periplasma, interaccionando con el receptor. Se cree que al energizarse TonB, este produce un cambio conformacional en un motivo estructural del receptor que normalmente está actuando como un “tapón” del poro del receptor. Así TonB, “jala” el tapón, abriendo el poro y permitiendo la entrada del sustrato [73]. Un esquema del transporte dependiente de TonB se muestra en la figura 14.

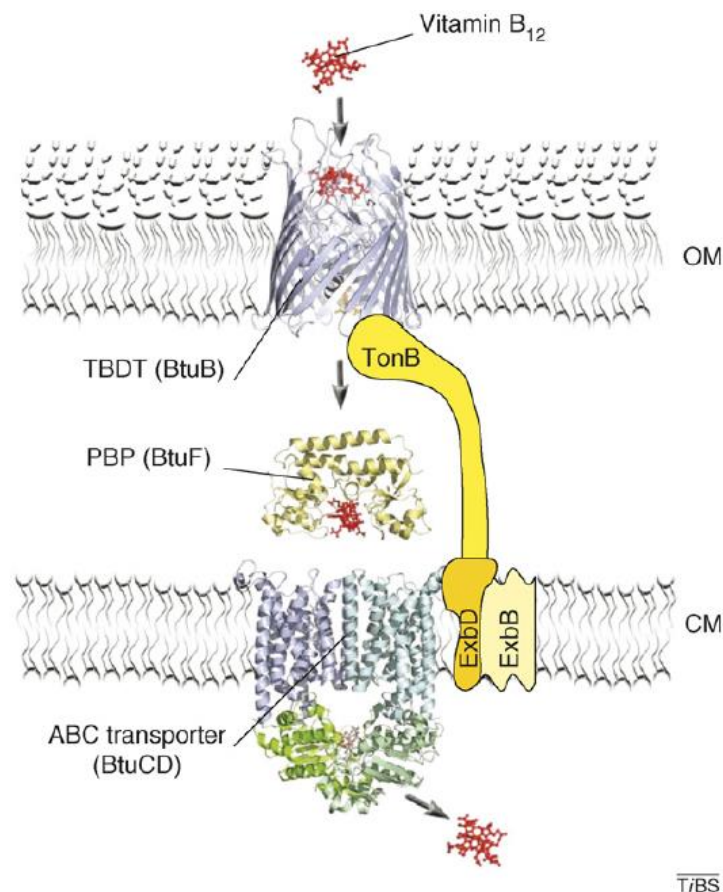


Figura 14 Esquema del transporte dependiente de TonB

En esta imagen se muestra uno de los muchos sustratos transportados de manera dependiente de TonB. La vitamina B12, primero debe unirse a su receptor en la membrana interna, BtuB. TonB interacciona directamente con este receptor para proveer la energía para importar el sustrato. Posteriormente, la vitamina se une a una proteína periplásmica BtuF hasta unirse a un transportador ABC, el cual, mediante la hidrólisis de ATP, provee la energía para transportar el sustrato al citoplasma. Tomado de [74].

REFERENCIAS

1. Terashima, H., S. Kojima, and M. Homma, *Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008. 270: p. 39-85.
2. Chevance, F.F. and K.T. Hughes, *Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. 6(6): p. 455-65.
3. Zhou, J., S.A. Lloyd, and D.F. Blair, *Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(11): p. 6436-41.
4. Madigan, M., J. Martinko, and T. Brock, *Brock biology of microorganisms*. 2006, Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Prentice Hall.
5. Kojima, S. and D.F. Blair, *Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2004. 43(1): p. 26-34.
6. Kojima, S., et al., *Na⁺-driven flagellar motor resistant to phenamil, an amiloride analog, caused by mutations in putative channel components*. *J Mol Biol*, 1999. 285(4): p. 1537-47.
7. De Mot, R. and J. Vanderleyden, *The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan*. *Mol Microbiol*, 1994. 12(2): p. 333-4.
8. Braun, T.F., et al., *Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2004. 43(1): p. 35-45.
9. Hosking, E.R., et al., *The Escherichia coli MotAB proton channel unplugged*. *J Mol Biol*, 2006. 364(5): p. 921-37.
10. Zhou, J., et al., *Function of protonatable residues in the flagellar motor of Escherichia coli: a critical role for Asp 32 of MotB*. *J Bacteriol*, 1998. 180(10): p. 2729-35.
11. Kojima, S. and D.F. Blair, *Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor*. *Biochemistry*, 2001. 40(43): p. 13041-50.
12. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell*. Fifth ed. 2009, New York: Garland Science.
13. Alberts, B., J.H. Wilson, and T. Hunt, *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science. xxxiii, 1601, 90 p.
14. Hizukuri, Y., S. Kojima, and M. Homma, *Disulphide cross-linking between the stator and the bearing components in the bacterial flagellar motor*. *J Biochem*, 2010. 148(3): p. 309-18.
15. Morimoto, Y.V., et al., *Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation*. *J Bacteriol*, 2013. 195(3): p. 474-81.
16. Ferla, M.P., et al., *New rRNA gene-based phylogenies of the Alphaproteobacteria provide perspective on major groups, mitochondrial ancestry and phylogenetic instability*. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e83383.

17. Dunstan, R.H., B.C. Kelley, and D.J. Nicholas, *Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, Rhodospseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans*. J Bacteriol, 1982. 150(1): p. 100-4.
18. Porter, S.L., et al., *Genome sequence of Rhodobacter sphaeroides Strain WS8N*. J Bacteriol, 2011. 193(15): p. 4027-8.
19. Kontur, W.S., et al., *Revised sequence and annotation of the Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 genome*. J Bacteriol, 2012. 194(24): p. 7016-7.
20. Choudhary, M., et al., *Multiple chromosomes in bacteria: structure and function of chromosome II of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1T*. J Bacteriol, 1994. 176(24): p. 7694-702.
21. Poggio, S., et al., *A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2007. 189(8): p. 3208-16.
22. Suaste-Olmos, F., et al., *The flagellar protein FliL is essential for swimming in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2010. 192(23): p. 6230-9.
23. Fabela, S., et al., *A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 2013. 195(23): p. 5285-96.
24. Ramirez-Cabrera, V., et al., *A novel component of the Rhodobacter sphaeroides Fla1 flagellum is essential for motor rotation*. J Bacteriol, 2012. 194(22): p. 6174-83.
25. Attmannspacher, U., B.E. Scharf, and R.M. Harshey, *FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2008. 68(2): p. 328-41.
26. Jenal, U., J. White, and L. Shapiro, *Caulobacter flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types*. J Mol Biol, 1994. 243(2): p. 227-44.
27. Terashima, H., et al., *The flagellar basal body-associated protein FlgT is essential for a novel ring structure in the sodium-driven Vibrio motor*. J Bacteriol, 2010. 192(21): p. 5609-15.
28. Terashima, H., et al., *Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven Vibrio flagellar motor from the structure of FlgT*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(15): p. 6133-8.
29. Terashima, H., et al., *The Vibrio motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation*. Mol Microbiol, 2006. 62(4): p. 1170-80.
30. Sistrom, W.R., *The kinetics of the synthesis of photopigments in Rhodospseudomonas spheroides*. J Gen Microbiol, 1962. 28: p. 607-16.
31. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. 62(3): p. 293-300.
32. Louvet, O., F. Doignon, and M. Crouzet, *Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system*. Biotechniques, 1997. 23(5): p. 816-8, 820.

33. Mead, D.A., E. Szczesna-Skorupa, and B. Kemper, *Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering*. Protein Eng, 1986. 1(1): p. 67-74.
34. Keen, N.T., et al., *Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria*. Gene, 1988. 70(1): p. 191-7.
35. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
36. Soding, J., A. Biegert, and A.N. Lupas, *The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(Web Server issue): p. W244-8.
37. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. 252(5009): p. 1162-4.
38. Witty, M., et al., *Structure of the periplasmic domain of Pseudomonas aeruginosa TolA: evidence for an evolutionary relationship with the TonB transporter protein*. EMBO J, 2002. 21(16): p. 4207-18.
39. Brown, A.M. and N.J. Zondlo, *A propensity scale for type II polyproline helices (PPII): aromatic amino acids in proline-rich sequences strongly disfavor PPII due to proline-aromatic interactions*. Biochemistry, 2012. 51(25): p. 5041-51.
40. Kohler, S.D., et al., *The proline-rich domain of TonB possesses an extended polyproline II-like conformation of sufficient length to span the periplasm of Gram-negative bacteria*. Protein Sci, 2010. 19(4): p. 625-30.
41. Martinez, R.M., et al., *Role of FlgT in anchoring the flagellum of Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 2010. 192(8): p. 2085-92.
42. Hildebrand, A., et al., *Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred*. Proteins, 2009. 77 Suppl 9: p. 128-32.
43. Lloubes, R., et al., *The Tol-Pal proteins of the Escherichia coli cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity?* Res Microbiol, 2001. 152(6): p. 523-9.
44. Kleanthous, C., *Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(12): p. 843-8.
45. Cascales, E., R. Lloubes, and J.N. Sturgis, *The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB*. Mol Microbiol, 2001. 42(3): p. 795-807.
46. Zhai, Y.F., W. Heijne, and M.H. Saier, Jr., *Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB*. Biochim Biophys Acta, 2003. 1614(2): p. 201-10.
47. Adzhubei, A.A., M.J. Sternberg, and A.A. Makarov, *Polyproline-II helix in proteins: structure and function*. J Mol Biol, 2013. 425(12): p. 2100-32.
48. Larsen, R.A., G.E. Wood, and K. Postle, *The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by Escherichia coli TonB protein*. Mol Microbiol, 1993. 10(5): p. 943-53.
49. Derouiche, R., et al., *Protein complex within Escherichia coli inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins*. J Biol Chem, 1995. 270(19): p. 11078-84.

50. Curran, A.R. and D.M. Engelman, *Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins*. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. 13(4): p. 412-7.
51. Morimoto, Y.V., et al., *Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor*. *Mol Microbiol*, 2010. 78(5): p. 1117-29.
52. Takekawa, N., S. Kojima, and M. Homma, *Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque generation in *Vibrio alginolyticus**. *J Bacteriol*, 2014. 196(7): p. 1377-85.
53. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. 2013, New York: W.H. Freeman.
54. Junge, W. and N. Nelson, *ATP Synthase*. *Annu Rev Biochem*, 2015.
55. Meister, M., G. Lowe, and H.C. Berg, *The proton flux through the bacterial flagellar motor*. *Cell*, 1987. 49(5): p. 643-50.
56. Journet, L., et al., *Role of TolR N-terminal, central, and C-terminal domains in dimerization and interaction with TolA and tolQ*. *J Bacteriol*, 1999. 181(15): p. 4476-84.
57. Goemaere, E.L., et al., *Movements of the TolR C-terminal domain depend on TolQR ionizable key residues and regulate activity of the Tol complex*. *J Biol Chem*, 2007. 282(24): p. 17749-57.
58. Derouiche, R., et al., *Circular dichroism and molecular modeling of the *E. coli* TolA periplasmic domains*. *Biospectroscopy*, 1999. 5(3): p. 189-98.
59. Levengood, S.K., W.F. Beyer, Jr., and R.E. Webster, *TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(14): p. 5939-43.
60. Abergel, C., et al., *Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution*. *Structure*, 1999. 7(10): p. 1291-300.
61. Walburger, A., C. Lazdunski, and Y. Corda, *The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB*. *Mol Microbiol*, 2002. 44(3): p. 695-708.
62. Liang, M.D., et al., *Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein: a naturally occurring toll-like receptor 2 agonist that is shed into serum and has synergy with lipopolysaccharide*. *J Infect Dis*, 2005. 191(6): p. 939-48.
63. Cascales, E. and R. Lloubes, *Deletion analyses of the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal reveals three independent binding sequences including a TolA box*. *Mol Microbiol*, 2004. 51(3): p. 873-85.
64. Parsons, L.M., F. Lin, and J. Orban, *Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein*. *Biochemistry*, 2006. 45(7): p. 2122-8.
65. Bonsor, D.A., et al., *Allosteric beta-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins*. *EMBO J*, 2009. 28(18): p. 2846-57.
66. Garcia-Herrero, A., et al., *The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins*. *Mol Microbiol*, 2007. 66(4): p. 872-89.

67. Braun, V., et al., *Energy-coupled transport across the outer membrane of Escherichia coli: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity.* J Bacteriol, 1996. 178(10): p. 2836-45.
68. Ollis, A.A., et al., *Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB.* Mol Microbiol, 2009. 73(3): p. 466-81.
69. Krewulak, K.D. and H.J. Vogel, *TonB or not TonB: is that the question?* Biochem Cell Biol, 2011. 89(2): p. 87-97.
70. Chang, C., et al., *Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold.* J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 27535-40.
71. Postle, K. and R.A. Larsen, *TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes.* Biometals, 2007. 20(3-4): p. 453-65.
72. Larsen, R.A., T.E. Letain, and K. Postle, *In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2003. 49(1): p. 211-8.
73. Gumbart, J., M.C. Wiener, and E. Tajkhorshid, *Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport.* Biophys J, 2007. 93(2): p. 496-504.
74. Schauer, K., D.A. Rodionov, and H. de Reuse, *New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'?* Trends Biochem Sci, 2008. 33(7): p. 330-8.